



Tesis Doctoral

“Evaluación del efecto de los inhibidores de la nitrificación derivados de dimetilpirazol y la nutrición amoniacal sobre la fisiología de las plantas”

Memoria presentada por Janaína Maria Rodrigues dos Santos para optar al grado de Doctor
con mención de “Doctor Internacional”

Pamplona, marzo de 2018.

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA LA PRESENTACIÓN

Dr. Pedro M^a Aparicio Tejo, Catedrático de Universidad del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra,

Dra. Carmen González Murua, Catedrática de Universidad del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad País Vasco,

Dra. Berta Lasa, del Área de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “**Evaluación del efecto de los inhibidores de la nitrificación derivados de dimetilpirazol y la nutrición amoniacal sobre la fisiología de las plantas**” que presenta **Dña. Janaína María Rodrigues dos Santos** para optar al grado de Doctor con mención de “**Doctor Internacional**” en el Programa Interuniversitario de Doctorado de **Agrobiología Ambiental**, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección en los laboratorios de Fisiología Vegetal, del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra.

Revisado el trabajo, consideran que reúne las condiciones necesarias para su defensa, por lo que autorizan la presentación de la citada Tesis Doctoral.

En Pamplona, a 5 de marzo de 2018.

Fdo. Dr. Pedro M. Aparicio-Tejo

Dra. Carmen González Murua

Dra Berta Lasa

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2015-64582-C3-1-R del Ministerio Economía y Competitividad.

Para su realización he contado con una beca predoctoral para formación del personal investigador a través del Gobierno Brasileño, por la CAPES.

“A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas a inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota, o pódio para a vitória, das críticas, o palco, de onde receberam os aplausos. Sonhos perseguidos com perseverança, sempre acabam em realidade”.

Augusto Cury

Nunca desista de seus sonhos

“We are shaped by our thoughts; we become what we think. When the mind is pure, joy follows like a shadow that never leaves.”

Buddha

A mis padres, Adélia y Carlos y
mi hermano, Filipe

A mi abuela Maria (*in memoriam*)

AGRADECIMIENTOS

“Poco a poco”, ya han pasado más de 4 años de esta experiencia única en mi vida personal y profesional, donde reinó la sonrisa por encima de las lágrimas. Nadie me lo ha dicho que sería fácil, aunque el camino es largo y duro, pero cuando ves el trabajo hecho, sabes que todo ha merecido la pena. Sería injusto no agradecer a todas las personas que hicieron y hacen parte de toda esta trayectoria.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis: Dr. Pedro María Aparicio Tejo, Dra. Carmen González Murua y Dra. Berta Lasa. Carmen, gracias por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en este grupo; Pedro, gracias por la oportunidad de realizar la tesis con vosotros, por recibirme tan bien en Pamplona y principalmente por tu inagotable paciencia, tu cercanía, por tener siempre la puerta del despacho abierta y por compartir tus conocimientos.

Berta, ¡madre mía!, ¡cómo te admiro!, Gracias por enseñarme a pensar despacio para aprender deprisa, por enseñarme que con resultados se demuestra el trabajo hecho. ¡MUCHÍSIMAS GRACIAS por tu paciencia, tus consejos, por tu total entrega en todo lo que haces y principalmente por creer en mí! Eres increíble y me alegra mucho haberte conocido y que nuestra amistad siga por muchos años. Has sido para mí amiga, madre, compañera de trabajo y un gran ejemplo tanto en la vida personal como profesional. Esta tesis también te la dedico a ti, gracias, mil gracias.

A CAPES por la beca predoctoral durante los 4 años para la realización de la tesis.

Gracias a todos los que hacen parte del Departamento de Ciencias del Medio Natural: Dra. Ana Zabalza, Dra. Esther González, Dr. José Fernando Morán, Dr. Iker Aranjuelo, Dra. Mercedes Arroyuela, Dr. Cesar Arrese-Igor, Dra. Susana García, gracias por las charlas y los buenos momentos sea en la hora del café o en la hora de la comida.

A Gustavo Garijón, ¿qué sería de mí sin ti en el laboratorio? Gracias por tu amabilidad, paciencia y ayuda en todos los momentos. Por las charlas y risas en la hora de la comida. Es un placer haber tenido la oportunidad de compartir laboratorio contigo.

Muchísimas gracias a mis queridos compañeros de laboratorio y becarios, y espero no olvidarme de ninguno. A los que ya no están trabajando en la UPNA: Iratxe, Oscar Irantzu, Iván, Karla. A los que siguen aquí: Manu, Andrés, María, Ester González, Esti (la super mami). A Joseba, mi chico guapo, muchas gracias por tu amistad y por el título de “eusko-brasileña”, eres muy especial para mí. A Mirian, por tu paciencia, tu ayuda en

la locura del “formateo” y por hacer que yo me enamorara de los geles. A Amaia, por la cuajada que sigo esperando jaja, es broma, gracias por los buenos momentos sea en la “uni” o en los rollitos chinos. A Libertuki, gracias por las risas, las cervecitas y los whatsapp. A Ainhoa, por las trenzas sea en el pelo o las de chocolate, pero siempre estupendas. A David, el eusko-manchego, has llegado para alegrar nuestros días. Idoia, gracias por compartir conmigo un poco de tu pasión por la nutrición amoniacal. A Vero, mi modelo favorita, aunque no estuviera presente físicamente has estado siempre conmigo en esta jornada, y me has enseñado que el Excel hace maravillas. Maribel, gracias por los buenos momentos que hemos pasado, las risas que echamos y por ser esa persona tan amable y siempre disponible, ¡ánimo que ya te queda poco!

A mis compañer@s y ex compañer@s de despacho, gracias por haber hecho sentirme parte de la familia “Producción Agraria”. A Maren, por enseñarme cómo afrontar el “mundo del papeleo” y por seguir motivándome, aunque no compartamos diariamente el despacho, te echo de menos y deseo que seas muy muy feliz donde sea con Sergio y Lur. Francesco, ¡qué grande eres, por dentro y por fuera! A Leticia, gracias por tu amabilidad. A Leire, por tu enorme paciencia, por escucharme, por estar siempre ahí, echándome una mano, y por los ratos en el café o la comida. A María Duran, “Miss *Brachypodium*”, gracias por traerme chuches para que los sábados fueran menos duros. A Natxo, por los ratitos en el café y las comidas en la sociedad. A Rosa Canals y Julio Muro, gracias por compartir las comidas sea de San Fermín o Navidad y las conversaciones en los pasillos. Alessandra, Raúl, Manu, gracias por las muchas tardes y sábados en la universidad.

En la UPV/EHU, gracias a Sergio, por tu amistad y por los ratitos en las comidas en Pamplona. A Teresa, por las risas y buenos momentos en los días en el laboratorio en Pamplona, por motivarme a ser siempre mejor. Fernando, mi compañero en este largo trayecto, al final, hemos terminado a la par, gracias por las muchas risas, te deseo lo mejor del mundo. Asier y Ander, gracias por los ratos de muchas risas y las charlas interminables en los congresos. Dani, gracias por tu participación en este trabajo en los últimos meses y por enseñarme como dice la canción que “quien cree siempre alcanza”.

A Antonio Márquez, Carmen Pérez Delgado, Margarita Calderón, gracias por los días en vuestro laboratorio y ayuda en el análisis transcriptómico. Marco Betti, mil gracias, por todo lo que me enseñaste, por tu amabilidad, por estar siempre disponible y por hacer que los días que pasé en vuestro laboratorio fuera de mucho aprendizaje.

A mí cuadrilla (al final ya se nota que soy casi una Pamplonica, jajaja): Emme, guapi, eres la mejor enóloga de Bordeaux, gracias por enseñarme el fantástico mundo de los vinos, por tu amistad y que las risas nunca nos falten. Miri, menos mal que estás con nosotras, eres la normalidad en el medio de tanta locura. Lucía, “tíaaaaaa”, a ver si dejas de poner excusas jajaja!!!! Maricota, para ti me faltan palabras para describirte, no conozco a nadie tan fuerte como tú, gracias por tu amistad tan verdadera, por estar SIEMPRE a mí lado, por hacerme sentir casi una guarda forestal, por apoyarme en TODO, y por ser quién eres, ¡Te quiero! Chicas, ¡muchísimas gracias por todo! Josefina, friend, gracias por inundar mi vida con tanta alegría y energía positiva.

Als meus amics de València: João, Moltíssimes gràcies per obrir-me les portes de la teua casa quan més ho vaig necessitar, per la teua amabilitat i amistat. Moni, companyera dins i fora del tatami, la distància i el temps mai han sigut un obstacle per a nosaltres. Ana Laura, gràcies per traure el reggaetón quan pareixa tot destartalat, has començat a estudiar portugués per a viatjar a Brasil, jajaj quin honor, així que ja pots comprar-hi el bitllet! Jesu, nano, eres el millor germà del món, gràcies per tot, al final son setze anys de amistat. Elena, Alba, Virginia, Marta Valero, Fabio, moltes gràcies per tot!

Asier, Perico, Mintxo, Julen, gracias por los ratitos que me habéis sacado del “mundo de la ciencia” para adentrarme en el loco mundo forestal.

A los del pueblo (Orísoain): Fermín, Cristian, Ferminito, Javi, gracias por los 6 de julio. Que se repitan durante muchísimos años.

A los compañeros de judo de Valencia, Pamplona, Oporto: el deporte abre puertas a donde vayas. El tatami fue, es y siempre será mi segunda casa. A la gran familia Paleo, muchísimas gracias por los momentos de desconexión. A l@s chic@s de Le bal, gracias por sacarme el bailado.

Em Portugal...

Muito obrigada à equipa das “Nitrosocoisas”. Catarina, obrigada pelas análises realizadas depois que regressei para Espanha, pelos bolos maravilhosos que fizeste, por mostras-me como o mundo da microbiologia é fascinante. Juliana, és a brasileira mais portuguesada que conheço, foi realmente amiga nesses três meses que estive aí, obrigada pelo ombro amigo e pelas “imperais” depois do laboratório, podes contar sempre comigo! Prof.^a Manuela, D. Manuela, João, Inês, Margarida, José, obrigada por fazerem meus dias mais alegres na Faculdade de Ciências (FC-Lisboa). D. Herculana,

foi mãe, amiga, conselheira, obrigada por cuidar de mim como uma verdadeira filha. Prof. Rogério, obrigada pela oportunidade de aprender consigo. Prof.^a Cristina, a senhora é toda uma inspiração para mim, obrigada pelos momentos maravilhosos em Lisboa e por dividir sua tão concorrida sala comigo.

Às minhas meninas “mixotróficas”, Carolina e Raquel, muito obrigada. Os anos passam e além de ficarmos mais bonitas, nossa amizade continua firme e forte. Carolina, obrigada pela tua amizade desde o Mestrado e por me apoiares e motivares a seguir adiante. Raquel, ou melhor, Rachel, fostes e és a melhor amiga que alguém pode ter, no Porto ou em Londres, a distância é um mero detalhe, obrigada por TUDO. Fabi y Pedro, obrigada pela amizade e companheirismo desde Marinha Grande, pelas visitas seja em Pamplona, Lisboa ou no Porto. Vocês são incríveis.

No Brasil...

À minha pequena-grande família, LOBATADA, talvez eu jamais consiga definir minha família, cada um com seus detalhes e peculiaridades. Meu muito obrigada a cada um de vocês que sempre me apoiaram e quando possível encurtaram esses quilômetros que nos separam, vindo me visitar, em um dos lugares mais frios que vocês já estiveram. Muito obrigada!!

Aos meus pais: Adélia (Fofinha) e Carlos (Daddy), obrigada por serem minha fonte de inspiração tanto na vida pessoal como profissional. Ao meu irmão, Filipe (Fofinho), se pudesse escolher outro irmão, sempre escolheria você! Vocês me ensinaram que com honestidade, esforço, estudo e perseverança se chega longe. E nesses 4 anos me orgulho de não ter falhado o que vocês me ensinaram. Foram muitos aniversários perdidos, festas de família, porém vocês sempre amenizaram essa dor e/ou distância. Obrigada, AMO VOCÊS!

Aos meus amados e incríveis tios, que sorte tenho pela família abençoada que Deus me deu: tio Manoel José, tia Isabel (Freira), tio Rômulo, tia Francisca, tio Ricardo, tia Teodósia, tio Ayres, longe ou perto, com visitas em Pamplona ou um simples telefonema ou mensagem, obrigada pelo apoio e amor incondicional. Aos meus primos, os melhores do mundo, que me proporcionaram momentos de descontração e sempre me apoiaram, meu muito obrigada. À minha tia Rosário que além de tia e segunda mãe, é para mim um exemplo de profissional e pesquisadora. Me abriu portas e mostrou-me esse mundo “louco” da ciência, muito obrigada tia.

Daniela, a boadrasta, obrigada por toda paciência e cuidados com meu pai, pelas palavras de apoio e pela visita em Pamplona.

Bruna, Fabíola, Aline, Marcus, Jú, Ale Portela, obrigada pela amizade e mesmo com a distância, se fazem presente na minha vida. Saulo, Léo e Rafa (afilhado), amo vocês. Sensei Júlio, obrigada por todos seus ensinamentos.

As “grilinhas falantes”, Isa, Tay, Lígia, Analice, Jú, Ellen, Brenda, espalhadas por esse mundão, obrigada pela força, e por amenizar o stress com boas risadas.

À EMBRAPA, obrigada a todas as pessoas que sempre tiveram as portas abertas para resolver qualquer dúvida. Dr Fermينو, Dr Ricardo Lopes, Dr Marcelo Roseo e ao meu querido chefe, Dr. Francisco Célio Maia Chaves, por introduzir-me no mundo das plantas, meus sinceros agradecimentos.

A ti Iván, la persona más importante. Gracias por “traerme” a Pamplona y vivir conmigo esta “aventura” que es la tesis. Gracias, por animarme y apoyarme cuando pensaba que no existía luz en el camino. Por enseñarme que cuando hacemos las cosas con amor, cosechamos buenos resultados. Gracias, por la persona que eres, por cuidarme y amarme, por ser mí familia (junto a la Danita) y mi todo, ¡Te quiero! Gracias a la familia Villar, en especial a Tere y Pepe que me siguen cuidado como una hija más.

A todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente en la realización de este trabajo, muchas gracias.

“O correr da vida embrulha tudo; A vida é assim: esquentada e esfria, apertada e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimaraes Rosa

Grande Sertão: Veredas (1956)

ABREVIATURAS

AMO	Amonio monooxigenasa
AMT	Sistemas de transporte de amonio
ANOVA	Análisis de varianza
AOA	Arqueas oxidantes de amonio
AOB	Bacterias oxidantes de amonio
AOX	Vías de la citocromo alternativa
AsA	Ascorbato
BSA	Seroalbúmina bovina
CAN	Nitrato amónico cálcico
CAT	Ácidos tricarboxílicos
CH ₄	Metano
Cit c	Vías de la citocromo oxidasa
CO ₂	Dióxido de carbono
DCD	Diciandiamida
DHA	Dehidroascorbato
DMP	Dimetilpirazol
DMPP	3,4-dimetilpirazol fosfato
DMPSA	2- (N-3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) succínica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol (treo-1,4-dimercapto-2,3-ditiol)
F	Fertilizado
FDR	Tasa de falsos positivos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GEI	Gases de efecto invernadero
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
HAO	Hidroxilamina oxidorreductasa
hGSH	Homoglutación
hGSSG	Homoglutation oxidado
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IN	Inhibidores de la nitrificación
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
LC	Dosis letal
LC-MS	Cromatografía líquida-espectrometría de masas
MDA	Malondialdehído
MTBE	Metil tert-butil éter
N	Nitrógeno
N ₂	Dinitrógeno
NBPT	N-(n-butil) Triamida Tiofosfórica

NIF	Nitrogenasa
NIR	Nitrito reductasa
Nitrapirina	2-cloro-6 (triclorometil) piridina
NMP	Número más probable
NOB	Bacterias oxidantes de nitrito
NOR	Óxido nítrico reductasa
NOS	Óxido nitroso reductasa
NR	Nitrato reductasa
NRT	Sistemas de transporte de nitrato
NSCC	Canales de cationes no selectivos
NUE	Eficiencia en el uso del N
NXR	Nitrito oxidorreductasa
OD	Densidad óptica
p/v	Peso/volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PF	Peso fresco
Pi	Fosfato inorgánico
PM	Peso molecular
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PS	Peso seco
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
Redox	Reducción-oxidación
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rr	Respiración residual
Rt	Respiración Total
SF	Sin fertilizar
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TF	Factor de transcripción
v/v	Volumen/volumen
WFPS	Espacios porosos llenos de agua en el suelo
$\delta^{15}\text{N}$	Composición isotópica del nitrógeno

RESUMEN

Los inhibidores de la nitrificación (IN) pueden ser bien productos biológicos producidos por las plantas o de síntesis química, estos últimos son añadidos a los fertilizantes granulados, solubles o líquidos y del mismo modo que los biológicos, son capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos nitrificantes.

Los inhibidores procedentes de la síntesis química se han venido utilizando desde hace décadas en la agricultura y han sido desarrollados para tratar de disminuir las pérdidas de N de los agrosistemas (lixiviado de nitrato y emisiones de óxidos de nitrógeno), aumentando la eficiencia del uso del N de los fertilizantes aplicados a los cultivos. Actualmente la dicianidamida (DCD) y el 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) son los IN comercializados más utilizados y estudiados. Un nuevo producto ha sido desarrollado recientemente, el ácido 2-(N-3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) succínico (DMPSA), y que pertenece al mismo grupo de los dimetilpirazoles. Aunque su eficiencia es similar al DMPP, hasta la fecha hay pocos estudios sobre esta nueva molécula y su modo de acción no está del todo resuelto. En este trabajo se ha estudiado el efecto de los IN derivados de dimetilpirazol, así como la nutrición amoniacal sobre la fisiología de las plantas, dado que el empleo de IN modifica la presencia de las formas de nitrógeno disponibles en el suelo a favor de una mayor presencia de amonio.

En nuestro estudio hemos observado que ambos IN derivados de dimetilpirazol, DMPP y DMPSA pueden ser absorbidos y translocados de la raíz hacia la parte aérea, aunque únicamente se ha observado afectación de las plantas con el DMPP a dosis muy elevadas. Para intentar dilucidar el posible modo de acción del DMPP sobre los procesos fisiológicos y metabólicos de la planta, se realizó un estudio con las herramientas moleculares (transcriptómica y proteómica), apoyados con estudios fisiológicos para así tener un mejor conocimiento de los mecanismos y rutas fisiológicas de las plantas que pudieran estar afectadas por el inhibidor.

Dado que los IN favorecen la presencia de amonio en el suelo durante mayor tiempo tras la aplicación de fertilizantes de base amoniacal hemos realizado un estudio del efecto de diferentes ratios de NO_3^- y NH_4^+ en plantas de guisante y

espinaca representativas de especies tolerantes y sensibles a la nutrición amoniacal. Hemos constatado que el mantenimiento del nivel de amonio en los tejidos es un factor importante en la respuesta a su tolerancia a esta fuente nitrogenada en las plantas.

ABSTRACT

Nitrification inhibitors (NI) can be either biological products produced by plants or by chemical synthesis. These latter are added to granulated, soluble or liquid fertilizers and, in the same way as biological ones, are able to inhibit the growth of nitrifying microorganisms.

Inhibitors from chemical synthesis have been used for decades in agriculture and have been developed to try to reduce N losses of agrosystems (nitrate leaching and nitrogen oxide emissions), increasing the efficiency in the use of N of fertilizers applied to crops. Currently, dicyandiamide (DCD) and 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) are the most used and studied commercialized NI. A new product has recently been developed, 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid (DMPSA), which belongs to the same group of dimethylpyrazoles. Although its efficiency is similar to DMPP, to date there are few studies on this new molecule and its mode of action is not completely resolved. In this work we have studied the effect of the NI derivatives of dimethylpyrazole, as well as the ammonia nutrition on the physiology of the plants, since the use of NI modifies the presence of the forms of nitrogen available in the soil in favor of a greater presence of ammonium.

In our study we have observed that both NI derivatives of dimethylpyrazole, DMPP and DMPSA, can be absorbed and translocated from the root to the aerial part, although only the plants have been affected with DMPP at very high doses. To try to elucidate the possible mode of action of the DMPP on the physiological and metabolic processes of the plant, a study was carried out with the molecular tools (transcriptomic and proteomic), supported by physiological studies in order to have a better knowledge of the mechanisms and physiological routes of plants that may be affected by the inhibitor.

Given that the NI favor the presence of ammonium in the soil for a longer time after the application of ammonium fertilizers, we have studied the effect of different ratios of NO_3^- and NH_4^+ in pea and spinach plants representative of tolerant and sensitive species in ammonium nutrition. We have verified that the maintenance of the level of ammonium in the tissues is an important factor in the response to their tolerance to this nitrogen source in plants.

RESUMO

Os inibidores de nitrificação (IN) podem ser produtos biológicos produzidos pelas plantas ou por sínteses químicas, sendo que, os últimos adicionados a fertilizantes granulados, solúveis ou líquidos, tal como os biológicos, são capazes de inibir o crescimento de microrganismos nitrificantes.

Os inibidores precedentes da síntese química são utilizados há décadas na agricultura e foram desenvolvidos para diminuir as perdas de N dos agrossistemas (lixiviação de nitrato e emissões de óxido de nitrogénio), aumentando a eficiência do uso de N dos fertilizantes aplicados nos cultivos. Atualmente, os IN, dicianodiamida (DCD) e o fosfato de 3,4-dimetilpirazol (DMPP) são os inibidores mais comercializados, utilizados e estudados. Um novo produto foi recentemente desenvolvido - o ácido 2- (N-3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) succínico (DMPSA) e pertence ao grupo do dimetilpirazol. Embora sua eficiência é similar ao DMPP, até os dias de hoje existem poucos estudos sobre essa nova molécula e seu modo de ação que não está totalmente resolvido. Neste trabalho estudamos o efeito dos IN derivados do dimetilpirazol, bem como a nutrição à base de amónia na fisiologia das plantas, uma vez que o uso de IN modifica a presença das formas de nitrogénio disponíveis no solo em favor de uma maior presença de amónia.

No nosso estudo, observamos que ambos IN derivados de dimetilpirazol, DMPP e DMPSA, podem ser absorvidos e transportados da raiz para a parte aérea, embora apenas as plantas tenham sido afetadas com DMPP em doses muito altas. Para tentar esclarecer o possível modo de ação do DMPP sobre os processos fisiológicos e metabólicos da planta, realizou-se um estudo com as ferramentas moleculares (transcriptómica e proteómica), apoiado por estudos fisiológicos para conhecer melhor os mecanismos e rotas fisiológicas das plantas que podem ser afetadas pelo inibidor.

Sabendo que os IN favorecem a presença de amónia no solo por um período superior após a aplicação de fertilizantes à base de amónio, realizamos um estudo do efeito de diferentes proporções de NO_3^- e NH_4^+ , em plantas de ervilhas e de espinafres representativas de espécies tolerantes e sensíveis à nutrição à base de amónia. Observamos que um controlo de nível de amónia nos

tecidos vegetais é um fator importante na resposta das plantas à sua tolerância a esta fonte de nitrogénio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
A. GASES DE EFECTO INVERNADERO	2
A.1. EL NITRÓGENO Y LA NITRIFICACIÓN.....	4
A.2. LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA	7
A.3. INHIBIDORES DE LA NITRIFICACIÓN.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	11
CAPÍTULO 1.....	15
1.1. INTRODUCTION.....	17
1.2. MATERIALS AND METHODS.....	21
1.2.1. Hydroponic growth conditions	21
1.2.2. Plant DMPP extraction	21
1.2.3. Plant DMPSA extraction.....	22
1.2.4. DMPP and DMPSA determination.....	22
1.2.5. Germination toxicity test.....	25
1.2.6. Bioassay of toxicity with <i>Vibrio fischeri</i>	25
1.2.7. Statistical analysis.....	25
1.3. RESULTS AND DISCUSSION	27
1.3.1. Do DMPP and DMPSA cause phytotoxicity in plants grown in hydroponics?	27
1.3.2. Quantification of DMPP and DMPSA in clover	29
1.3.3. DMPP and DMPSA do not affect seed germination	31
1.3.4. Ecotoxicity assay of DMPP and DMPSA on <i>Vibrio fischeri</i>	33
1.4. CONCLUSION	37
CAPÍTULO 2.....	39
2.1. INTRODUCCIÓN	41
2.2. OBJETIVO	43
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	45
2.3.1. Material vegetal.....	45
2.3.2. Crecimiento de plantas de Lotus.....	45
2.3.3. Determinación y cuantificación de DMPP y DMPSA en tejidos de plantas de Lotus.....	47
2.3.4. Análisis transcriptómico	47
2.3.4.1. Preparación de las muestras y extracción de RNA.....	47
2.3.4.2. Hibridación de los microarrays y análisis de datos.....	48
2.3.5. Análisis proteómico.....	48
2.3.5.1. Preparación de las muestras	48
2.3.5.2. Identificación de péptidos y cuantificación	49

2.3.6. Medida de la respiración radicular	50
2.3.7. Contenido de antioxidantes.....	51
2.3.8. Determinación de la peroxidación lipídica	51
2.3.9. Determinación de proteínas carboniladas	52
2.3.10. Cuantificación de hormonas.....	52
2.3.11. Pigmentos fotosintéticos	53
2.3.12. Determinación C, N y composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$)	53
2.3.13. Extracción y determinación de ácidos orgánicos.....	54
2.3.14. Determinación de aminoácidos	55
2.3.15. Determinación de proteína soluble.....	55
2.3.16. Análisis estadístico	55
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.4.1. Acumulación de los inhibidores de la nitrificación (DMP y DMPSA) y efecto en el crecimiento de plantas de Lotus.....	57
2.4.3. Posibles aspectos fisiológicos afectados por el inhibidor de la nitrificación DMPP en plantas de Lotus	70
2.4.3.1 Metabolismo redox	70
2.4.3.2 Metabolismo hormonal	77
2.4.3.3. Pigmentos fotosintéticos.....	79
2.4.3.4. Metabolismo del carbono y nitrógeno	81
2.5. CONCLUSIONES.....	89
CAPÍTULO 3.....	91
3.1. INTRODUCCIÓN	93
3.2. OBJETIVO	97
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	99
3.3.1. Determinación de la actividad AMO y HAO en presencia de los inhibidores de la nitrificación	99
3.3.2. Determinación de DMPP y DMPSA en el cultivo.....	100
3.3.3. Análisis estadístico	101
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
3.4.1. Efecto del DMPP y DMPSA en la actividad de las bacterias oxidantes de amonio (AMO y HAO)	103
3.4.2. Contenido de DMPP y DMPSA en el cultivo	109
3.5. CONCLUSIONES.....	111
CAPÍTULO 4.....	113
4.1. INTRODUCCIÓN	115
4.2. OBJETIVO	119
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	121

4.3.1. Material vegetal.....	121
4.3.2. Condiciones de crecimiento	122
4.3.3. Medida del crecimiento	125
4.3.4. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total en la planta y estimación de la eficiencia del uso del N (NUE).....	125
4.3.5. Determinación isotópica ($\delta^{15}\text{N}$)	126
4.3.6. Determinación del contenido en plantas de NO_3^- , NH_4^+ y K^+ solubles.....	126
4.3.7. Cinéticas de absorción de nitrato y amonio.....	127
4.3.8. Análisis estadístico	129
4.4. RESULTADOS.....	131
4.4.1. Espinaca.....	131
4.4.2. Guisante	145
4.5. DISCUSIÓN	157
4.6. CONCLUSIONES.....	165
CONCLUSIONES GENERALES	167
CONCLUSÕES GERAIS	171
GENERAL CONCLUSIONS.....	175
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
DATOS SUPLEMENTARIOS.....	209

INTRODUCCIÓN GENERAL

A. GASES DE EFECTO INVERNADERO

La agricultura en las próximas décadas se enfrenta a dos grandes desafíos frente al cambio climático, por un lado, el de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) y por otro como adaptarse a un clima cambiante y más

variable (Lavallo et al., 2009, Smith y Olesen, 2010). El sector agrícola contribuye en la Unión Europea con alrededor del 10% de las emisiones antropogénicas totales de gases de efecto invernadero (GEI) (EEA, 2010b). Los gases de efecto invernadero son aquellos que absorben la radiación infrarroja en la atmósfera, atrapando el calor y calentando la superficie de la Tierra. El dióxido de carbono (CO_2), el metano (CH_4) y el óxido nitroso (N_2O) son los principales gases de efecto invernadero asociados con la agricultura. Otros GEI importantes incluyen el vapor de agua (H_2O), el ozono (O_3), compuestos de azufre, los compuestos orgánicos volátiles y halocarbonados (Fowler et al., 2009; Snyder et al., 2009).

El CO_2 , es un componente que se encuentra de forma natural en la atmósfera ya que es generado por la actividad de los seres vivos en los procesos de descomposición de la materia orgánica y la actividad respiratoria. Según Zeng et al. (2014) a partir de la denominada “Revolución Verde” el aumento de la concentración de CO_2 ha estado marcada por grandes variaciones. Las plantas consumen grandes cantidades de CO_2 a través de la fotosíntesis para producir alimentos, fibras y combustibles, pero todos estos productos vegetales eventualmente se convierten de nuevo en CO_2 cuando son consumidos o cuando se descomponen (Denman et al., 2007; Snyder et al., 2009).

El CH_4 es el hidrocarburo más abundante en la atmósfera. Es el segundo GEI más abundante y en importancia después del CO_2 y su concentración se ha incrementado más del doble desde la época preindustrial (Seinfeld y Pandis, 2006). El CH_4 es producido principalmente durante la descomposición anaeróbica de la materia orgánica en los ecosistemas naturales, ya que son extremadamente sensibles al oxígeno (Whitman et al., 2006). Smith et al. (2007) indicaron que, en la agricultura, las emisiones de metano son generados por la ganadería (estiércol), la quema de biomasa y los sistemas productivos en suelos inundados como en los que se cultiva el arroz. En el manejo y tratamiento de las aguas residuales también se emite metano, aunque en pequeñas cantidades.

Aunque en comparación con el CO_2 , el N_2O tenga una concentración más baja en la atmósfera, este es un gas de efecto invernadero extremadamente importante, debido a su largo tiempo de permanencia en la atmósfera y su gran capacidad de absorber energía (absorbe 200 veces más radiación infrarroja que el CO_2). El tiempo de permanencia del N_2O en la atmósfera es de 120 años, lo que resulta

en una concentración uniforme por toda la troposfera. Algunos registros indican que en la época preindustrial la concentración de N_2O era de 276 ppb, y desde entonces esta concentración se incrementó cerca de un 15%, llegando a las 320 ppb (Seinfeld y Pandis, 2006; World Meteorological Organization, 2009), aumentando la emisión antropogénica del GEI en un 7,9% (Smith et al., 2007). La agricultura es una importante fuente de N_2O , este gas se produce a partir del uso de fertilizantes nitrogenados y de las explotaciones ganaderas. Del Grosso et al. (2006) señalaron que además de aumentar las emisiones directas de N_2O en el suelo por desnitrificación y nitrificación, las prácticas agrícolas también pueden aumentar tanto la volatilización de amoníaco (NH_3) como la lixiviación de NO_3^- , de modo que el N volatilizado y/o lixiviado puede afectar a las emisiones de N_2O porque gran parte de este N se deposita en suelos agrícolas y no agrícolas y en el agua y están sujetos a transformaciones que pueden dar como resultado emisiones de N_2O .

A.1. EL NITRÓGENO Y LA NITRIFICACIÓN

El nitrógeno (N) es uno de los elementos importantes para la vida, ya que forma parte de numerosas biomoléculas fundamentales tanto estructural como funcionalmente en los seres vivos. Es un constituyente esencial de las plantas, en las que entra a formar parte de los compuestos orgánicos, proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, clorofilas etc. y está asociado con procesos fisiológicos, como el desarrollo y crecimiento de las plantas, la iniciación floral o el desarrollo de los frutos. Después del agua, el nitrógeno es el factor limitante de mayor incidencia en el crecimiento vegetal ya que es un nutriente clave en la producción de cultivos, por ser un elemento cuya disponibilidad es variable según las condiciones climáticas, tipo de suelo, etc.

La atmósfera es el principal depósito de N, en la que se encuentra en forma de N_2 (el N_2 constituye el 78% en volumen de la atmósfera), pero las plantas, a excepción de las leguminosas, no pueden incorporar el N_2 directamente. En el suelo el contenido de N puede variar entre 0,1% y 0,6% en los primeros 15 cm superficiales y está compuesto por una compleja mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos. Las ganancias, pérdidas y transformaciones de nitrógeno en el sistema suelo/planta afectan de forma importante a la disponibilidad del N para las plantas (Cameron et al., 2013).

El ciclo del nitrógeno (Figura 1) incluye la transformación biótica y abiótica de los compuestos de nitrógeno entre sus formas oxidadas y reducidas. Estas transformaciones se realizan en la atmósfera, en la biosfera y en la interacción entre ambas. El N_2 atmosférico puede ser fijado e introducido en la biosfera por los microorganismos diazótrofos, en forma de amoníaco (NH_3) o nitrógeno orgánico (grupo amino) y por el establecimiento de la simbiosis entre plantas leguminosas y microorganismos. El NH_3/NH_4^+ es la forma de nitrógeno inorgánico más abundante presente en la biosfera y puede ser liberada de la materia orgánica por la actividad microbiana denominada "amonificación" o "mineralización" (Bock y Wagner, 2006; Coskun et al., 2017).

La nitrificación es la transformación biológica de nitrógeno bajo forma amonio (NH_4^+)/amoníaco (NH_3) a las formas de N oxidado, nitrito y nitrato consecutivamente. En suelos aeróbicos, las bacterias claves en la nitrificación son las quimiolitotróficas y arqueas. La amonio monooxigenasa (AMO) es la enzima responsable de la primera etapa de la oxidación de amonio en el proceso de nitrificación produciendo hidroxilamina (NH_2OH) a partir de NH_4^+ , la cual a continuación es convertida a nitrito (NO_2^-) a través de la hidroxilamina oxido reductasa (HAO), que a su vez se convierte por el sistema de la nitrito oxidoreductasa (NXR) rápidamente a NO_3^- . (Fiencke et al. 2005; Bock and Wagner, 2006; Kox y Jetten, 2015).

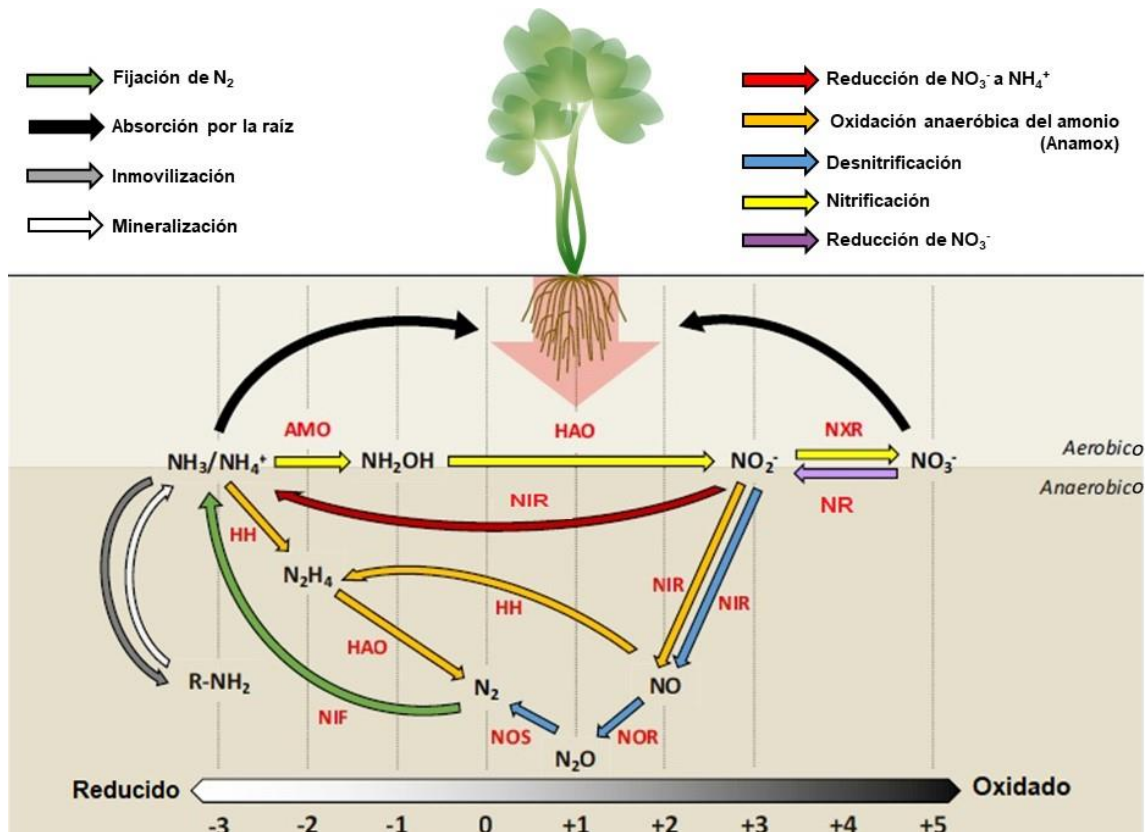


Figura 1: Ciclo del nitrógeno del suelo (Adaptado de Coskun et al., 2017). Las flechas de colores corresponden a transformaciones específicas de N (indicadas en la parte superior de la figura) que son catalizadas por enzimas específicas, que incluyen nitrato reductasa (NR), nitrito reductasas (NIR), óxido nítrico reductasa (NOR), óxido nitroso reductasa (NOS), nitrogenasa (NIF), amonio monooxigenasa (AMO), hidroxilamina oxidorreductasa (HAO), nitrito oxidorreductasa (NXR). La escala numérica en la parte inferior indica el estado de oxidación de los compuestos que contienen nitrógeno.

El proceso de desnitrificación tiene lugar bajo condiciones anóxicas, y según Kox y Jetten (2015) es el responsable de más del 20% de las pérdidas agrícolas de N del suelo. En este proceso el nitrato es utilizado por microorganismos desnitrificantes en una ruta de carácter desasimilatorio ya que este nitrato reducido no forma parte de la materia orgánica. El nitrato es reducido por la enzima nitrato reductasa (NR) generando NO_2^- que es convertido a óxido nítrico (NO) por la enzima nitrito reductasa (NIR). A partir del NO se genera N_2O por la enzima óxido nítrico reductasa (NOR) y el N_2O se transforma en dinitrógeno (N_2) por medio de la enzima óxido nitroso reductasa (NOS) (Bock y Wagner 2006; Subbarao et al, 2015; Coskun et al., 2017). El ciclo no es completamente lineal. Dependiendo de las condiciones del ecosistema, las respuestas de la comunidad microbiana cambian, por lo que los procesos clave indicados anteriormente

pueden afectar directamente la disponibilidad de N dentro de los ecosistemas. En este sentido, un aumento de nitrógeno en los ecosistemas puede aumentar la concentración de productos tóxicos, como amoníaco, nitrito, ácido nitroso y ácido nítrico, causando eutrofización en ecosistemas y contaminación de los suministros de agua subterránea (Fiencke et al., 2005). Por otra parte, una reducción de los niveles de nitrógeno puede afectar la fertilidad del suelo y a la producción de los cultivos (Bock y Wagner, 2006).

A.2. LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA

La fertilización nitrogenada tiene generalmente un gran efecto sobre el crecimiento de los cultivos, el rendimiento y la calidad de la cosecha. La estrategia más común es adecuar la dosis y el momento de aplicación del fertilizante nitrogenado a las necesidades del cultivo, teniendo en cuenta las características del producto utilizado (Grahmann et al., 2013). La eficiencia de un fertilizante se define como la cantidad de nutrientes aplicados que han sido recuperados por las plantas y se determina con base en diferentes aspectos de la producción. Sin embargo, las pérdidas de N están determinadas por diferentes aspectos ambientales, dentro de los cuales se destacan las características fisicoquímicas del suelo, la concentración de N, la humedad, el pH y la temperatura.

La fertilización nitrógenada puede ser aportado en los agrosistemas en forma orgánica procedente de residuos animales o vegetales o en forma mineral. Las plantas preferencialmente incorporan el nitrógeno del suelo en forma inorgánica NO_3^- y NH_4^+ , ambas formas son susceptibles de ser eliminadas del suelo, disminuyendo la eficiencia de los fertilizantes y produciendo daños medioambientales. Las estrategias para evitar estos efectos no deseados pasan por el desarrollo de herramientas y productos nuevos de fertilización que estabilizan el N en el suelo.

A.3. INHIBIDORES DE LA NITRIFICACIÓN

Las prácticas agrícolas que tengan como objetivo inhibir la amonificación y nitrificación, son en la actualidad de enorme interés en la agricultura, ya que producen una mayor permanencia del fertilizante nitrogenado (urea, derivados de la misma y demás formas amoniacales) en el suelo, resultando en un aumento

de la eficiencia del uso del N por el cultivo. En concreto, al inhibir la nitrificación ralentizando el paso de amonio a nitrito y este a nitrato, se reducen las pérdidas de N asociadas a los procesos de nitrificación como son desnitrificación y lixiviación, alcanzando así beneficios tanto ambientales como económicos (Schmidt, 1982; Yang et al., 2016). Los inhibidores de la nitrificación son compuestos químicos o biológicos añadidos a los fertilizantes (granulados, solubles o líquidos) que inhiben la actividad de la enzima AMO (Ruser y Schulz, 2015) y mantienen el N disponible en forma de amonio en el suelo el mayor tiempo posible. La AMO es la enzima responsable del proceso de oxidación de amonio, proceso que es llevado a cabo por las bacterias oxidantes de amonio (AOB) y arqueobacterias (AOA), organismos quimiolitotrofos oxidadores de NH_3 (Bock y Wagner, 2006; Subbarao et al., 2006). Las AOB pertenecen a diferentes géneros entre ellos, *Nitrosomonas*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus* y *Nitrosovibrio* (Junier et al., 2010; Purkhold et al., 2000) y están ampliamente estudiadas y descritas; sin embargo el grupo de las AOA no se han conseguido cultivar todavía muchas especies y sus vías metabólicas para la oxidación amonio aún no se encuentran suficientemente clarificadas. Recientemente se ha encontrado que las arqueas nitrificantes (AOA) están ampliamente distribuidas, particularmente en suelos ácidos, aunque en estos suelos sus actividades relativas a la oxidación de amonio podrían ser inhibidas a concentraciones elevadas de NH_4^+ (Prosser y Nicol, 2012; Coskun et al., 2017). Actualmente existen diferentes compuestos sintéticos (Akiyama et al., 2010) y naturales (Subbarao et al., 2015) que pueden actuar como IN (inhibidores de la nitrificación), siendo la dicianidamida (DCD) y el 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) dos de los IN más comúnmente utilizadas en Europa (Gilsanz et al., 2016), sin embargo, el modo de acción de estos inhibidores no se ha sido todavía determinado. Además de la eficacia en la inhibición de la nitrificación, la interacción de estos productos con el suelo está relacionada con propiedades y características del mismo como es su composición fisicoquímica y con propiedades ambientales como la temperatura, humedad y absorción microbiana (Zhang et al., 2004; Barth et al., 2008; Menéndez et al., 2012; Di et al., 2014; McGeough et al., 2016).

La DCD ha sido el principal inhibidor que ha venido siendo utilizado en varios países, debido a su bajo coste, su baja movilidad en el suelo y su baja solubilidad en agua que evita ser lavada (Giltrap et al., 2010). Varios estudios han demostrado una eficacia similar entre el DMPP y DCD, sin embargo, el DMPP reduce los problemas ecotoxicológicos relacionados con la DCD ya que se utiliza a una concentración 10 veces más baja que la DCD (Zerulla et al., 2001; Macadam et al., 2003; Benckiser et al., 2013), con una eficacia similar o incluso más elevada en la reducción de emisiones (Weiske et al., 2001).

Actualmente se ha desarrollado un nuevo inhibidor de la nitrificación, perteneciente a la familia de los dimetilpirazoles, el cual es una mezcla isomérica del ácido 2- (N-3,4-dimetil-1H-pirazol-1-il) succínico basada en el DMP. Este nuevo inhibidor DMPSA al igual que el DMPP ha sido desarrollado por la empresa AgroChem. El DMPSA difiere químicamente del DMPP en que el grupo DMP está ligado por un enlace covalente con succínico, en lugar del fosfato, y eso hace que este nuevo inhibidor sea más estable que el DMPP, pudiendo utilizarlo con otras formulaciones fertilizantes como el nitrato amónico cálcico (CAN) o el fosfato de diamonio que no podrían ser utilizados con inhibidores de la nitrificación como el DMPP (Torralbo et al., 2017). Ambos inhibidores son estructuralmente muy similares, pero aún no está demostrado si estos inhibidores tienen el mismo modo de acción y eficacia cuando se dirigen a los organismos nitrificantes del suelo, aunque han sido diseñados para que sea el grupo DMP el grupo activo.

OBJETIVO GENERAL

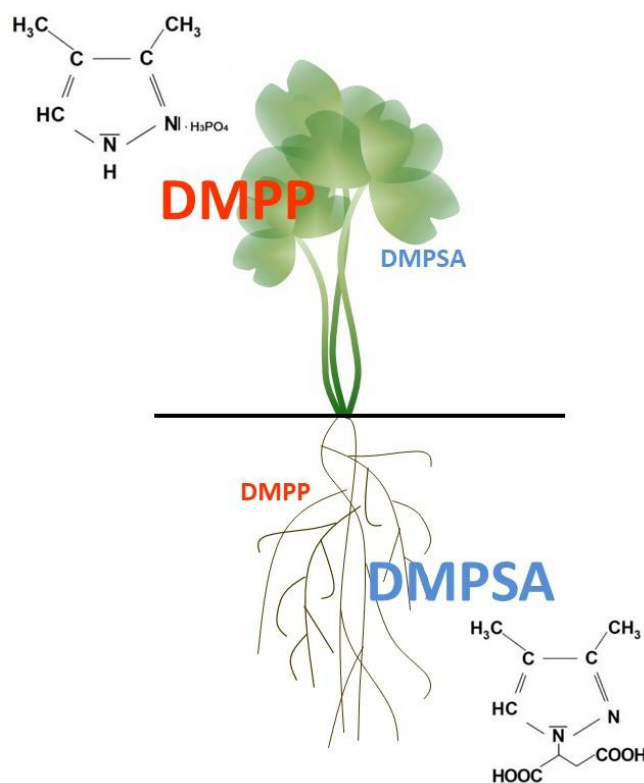
La agricultura moderna avanza hacia la neutralidad nitrogenada, concepto que representa un reto global dado la necesidad de reducir las pérdidas de N reactivo (nitrato, amoníaco, óxidos de N) al medio en los cultivos agrícolas. El uso de inhibidores de la nitrificación (IN) es de gran importancia debido que ralentizan el proceso de la nitrificación, promoviendo la reducción de pérdidas en forma de óxidos de N y pudiendo contribuir también en condiciones favorables al incremento del rendimiento y NUE. Sin embargo, una posible consecuencia de la continuada aplicación de fertilizantes nitrogenados con este tipo de moléculas inhibidoras sería la de una posible acumulación de estos productos químicos en el suelo y siendo por tanto susceptibles de ser absorbidas por los cultivos.

En base a eso el objetivo general de esta tesis es:

Estudiar la absorción y la potencial interacción de los inhibidores de la nitrificación 3,4-dimetilpirazol fosfato, DMPP y 3,4-dimetilpirazol succínico, DMPSA, con la fisiología y metabolismo de plantas y microorganismos nitrificantes.

En este contexto el objetivo general se desarrollará en cuatro apartados:

- 1º.** Desarrollo de un método de análisis de estas moléculas (DMPP y DMPSA) en tejidos de plantas de trébol y estudiar los posibles efectos tóxicos.
- 2º.** Estudiar las posibles alteraciones fisiológicas y metabólicas causadas por DMPP y DMPSA en la planta modelo *Lotus japonicus*, mediante técnicas de genómica funcional: transcriptómica y proteómica.
- 3º.** Evaluar la eficiencia de los inhibidores a base de dimetilpirazoles (DMPP y DMPSA) sobre la actividad amonio monooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) de microorganismos nitrificantes aislados del suelo.
- 4º.** Estudiar la función desarrollada por el nitrato en una nutrición mixta amonio-nitrato en especies sensibles y tolerantes a la nutrición amoniacal.



CAPÍTULO 1

3,4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays

1.1. INTRODUCTION

One of the most critical global challenges for the sustainability of highly productive agricultural systems is to maintain nitrogen neutrality, a new concept that reinforces the need to reduce N losses (leaching, ammonia volatilization, nitrogen oxides emission) from agriculture fields. These losses provoke both water and atmosphere contamination. Soil microbial processes (nitrification and denitrification) are the most important sources of N_2O and key players in controlling nitrate levels in the soil. In agriculture, nitrification is mainly driven by ammonium-oxidizing soil bacteria (AOB) and archaea (AOA). AOB and AOA use ammonium (NH_4^+) as source of energy, which is oxidized by ammonia monooxygenase enzyme to hydroxylamine, which is subsequently oxidized by hydroxylamine oxidoreductase to nitrite (NO_2^-) (Bock et al., 2006; Hatzenpichler et al., 2012). Afterwards, NO_2^- is further oxidized to nitrate (NO_3^-) by nitrite-oxidizing bacteria.

One strategy to reduce N losses is the use of chemical compounds as additives to nitrogenous fertilizers that block or delay specific soil microbial processes. This include urease inhibitors, such as urease inhibitors N-(n-butyl) thiophosphoric triamide (NBPT) that prevent urea degradation and nitrification inhibitors (NIs) that impede the oxidation of NH_4^+ to NO_2^- (Ruser and Schulz, 2015). The application of NIs together with ammonium-based fertilizers has been used to maintain NH_4^+ in the soil for longer periods of time while efficiently reducing N_2O emission and NO_3^- leaching; therefore, increasing the efficiency of the nitrogen fertilization (Merino et al., 2012; Menéndez et al., 2006; Akiyama et al., 2010). Indeed, their use has been advised by the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) as an efficient strategy to reduce N_2O emission, which is a greenhouse gas with great global warming potential (IPCC, 2014). There is a broad range of NIs of both biological and synthetic origin. The most regularly used and best understood are 2-chloro-6-(trichloromethyl)-pyridine (nitrapyrin), dicyandiamide (DCD), and 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). In the last decades, a significant number of studies have been performed focused on the effect of NIs on the N dynamic in soil and soil nitrifying bacterial populations (Hutchinson et al., 1993; McCarty, 1999; Webb et al., 1991). However, the undesirable effects that NIs might have on non-target organisms, including their

potential phytotoxicity, have not been extensively studied. Although their overall toxicity is low, there is an increasing concern about the impact that continuous application of NIs in one given site may have on plant growth and human health (Weiske et al., 2001; Yang et al., 2016). Nitrapyrin is applied with liquid fertilizers and has been shown to affect non-target processes such as microbial CH_4 oxidation (Topp et al., 1984) or sulfate reduction (Somerville et al., 1978). Moreover, phytotoxicity symptoms have sometimes been reported in plants when grown with nitrapyrin (Maftoun et al., 1981; 1982). DCD has several advantages compared to nitrapyrin since it can be coated in solid fertilizers and is more persistent (Subbarao et al., 2006). However, it has also been shown to sometimes provoke phytotoxic effects (Macadam et al., 2003; Reeves et al., 1986; Zerulla et al., 2001). More recently, some studies have detected a worrisome presence of DCD in milk products from animals grazed from pasture fertilized with DCD, thus, indicating the capacity of the plant to absorb DCD (Chen et al., 2014; Kim et al., 2012; Marsden et al., 2015; Pal et al., 2016). Similarly, it has also been reported the plant capacity to take up NBPT urease inhibitor, which indeed had an effect on plant endogenous urease, thus influencing plant metabolism (Ariz et al., 2012; Cruchaga et al., 2013). Regarding DMPP, is overall considered as less toxic than DCD, mostly because its recommended application rate is one-tenth of DCD (Macadam et al., 2003; Zerulla et al., 2001). Weiske et al. (2001) reported higher persistence in the soil of DMPP compared to DCD, reaching at the end of the growing season to ca. 15% of the applied original DMPP amount.

In this context and considering the limited reports on DMPP toxicity and the absence of studies describing the potential plant capacity to take up and store DMPP, in this work we evaluated the capacity of the plant to take up and translocate DMPP and the potential phytotoxic effects that DMPP may have. Besides DMPP, we also used a new DMP-based NI, the 2-(N-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture (DMPSA) that is more stable than DMPP in alkaline conditions and allows its combination with calcium ammonium nitrate or diammonium phosphate. To our knowledge, there are only two works where the efficiency of DMPP and DMPSA is compared: Huérfano et al., (2016) observed, in a wheat-field experiment, the same behavior for both NIs in terms of N_2O fluxes control and crop yield and quality and Torralbo et al., (2017) reported,

in a laboratory incubation study, a similar effect of both NIs on nitrifying and denitrifying microbial populations and N₂O emission.

1.2. MATERIALS AND METHODS

1.2.1. Hydroponic growth conditions

Seeds of red clover (*Trifolium incarnatum* L.) were sown in perlite: vermiculite mixture (1:2) and watered with deionized water every two days. Seven-day-old seedlings were transferred to aerated hydroponic culture in 3 L tanks with 10 plants per tank. The plants were kept in a growth chamber under controlled conditions (12 hours light/dark period, 22/16°C (light/dark) temperature, a relative humidity of 60/70% (light/dark) and a light intensity of 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Nutrient solution was adapted from Rigaud and Puppo (1975) and contained 1.15 mM K_2HPO_4 ; 2.68 mM KCl ; 5 mM NO_3NH_4 ; 0.7 mM CaSO_4 ; 0.07 mM $\text{Na}_2\text{Fe-EDTA}$; 0.85 mM MgSO_4 ; 16.5 μM Na_2MoO_4 ; 3.7 μM FeCl_3 ; 3.4 μM ZnSO_4 ; 16 μM H_3BO_3 ; 0.5 μM MnSO_4 ; 0.1 μM CuSO_4 ; 0.2 μM AlCl_3 ; 0.1 μM NiCl_2 ; 0.06 μM KI . The nutrient solution was renewed once a week and the pH adjusted every two days, maintaining it between 6.0-6.5. Twenty-one days after plant transfer, at the same time of renewing the nutrient solution, plants were exposed to different doses of DMPP and DMPSA (0, 0.5, 1, 10 and 100 ppm). Highly pure (99.9% purity) DMPP and DMPSA were kindly supplied by the manufacturer (EuroChem Agro Iberia SL, Barcelona, Spain). One week after treatment, five plants were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for DMPP and DMPSA quantification. The other five plants were used to determine shoots and roots dry weight after drying plant material during 48 hours at 70 °C. The experiment was repeated two times.

1.2.2. Plant DMPP extraction

DMPP extraction was adapted from a previously published method (Benckiser et al., 2013). Two grams of leaf and root samples were ground with liquid nitrogen and homogenized with 10 mL of ultrapure water. The homogenate was filtered through Miracloth paper. Five mL of homogenate were centrifuged during 10 min at 6000 g and 0.5 mL of NaOH 1M was added to the recovered supernatant. Then, 1 mL of t-butyl-methyl-ether phase (MTBE) was added, gently mixed and the upper phase with DMPP, now in form of dimethylpyrazole (DMP, Benckiser et al. 2013) dissolved in MTBE was recovered. This step was repeated three times, collecting the three phases together. Afterwards, 0.2 mL of HPLC eluent

without methanol (1 mM H₃PO₄, 5 mM KH₂PO₄) and the MTBE were evaporated at 30°C during 10 min with a TurboVap® LV Evaporator (Zymark, Sotax AG, Nordring, Switzerland). Therefore, DMP remains dissolved in the HPLC eluent and it can be quantified. To test the recovery rate of DMPP after the extraction, we doped leaf extracts with 5 ppm DMPP and we recovered the 92 ± 2 % of the applied DMPP.

1.2.3. Plant DMPSA extraction

DMPSA is an isomeric mixture of 2-(2,3-dimethyl-1 H-pirazol-1-il) succinic acid (2,3 DMPSA) and 2-(3,4-dimethyl-1 H-pirazol-1-il) succinic acid (3,4 DMPSA) in an approximate proportion of 20:80 (Patent WO2015086823). To extract DMPSA from plant material we developed a new methodology. To do so, 0.25 g of leaves and roots were ground with liquid nitrogen and homogenized with 5 and 3 mL of 4% H₃PO₄ for leaves and roots, respectively. The homogenates were centrifuged during 10 min at 6000 *g* and a solid-phase extraction was performed with the recovered supernatant using 6 cc Oasis MCX cartridges of 150 mg (Waters SAS, Saint-Quentin, France) connected to a vacuum manifold. To do so, the cartridges were conditioned with 3 mL methanol and equilibrated with 3 mL ultrapure water prior to sample application. Afterwards, the cartridges were washed with 4 mL of 2% formic acid and again with 3 mL methanol. Finally, DMPSA was eluted with 4 mL of 5% NH₄OH in methanol. This phase was then completely evaporated at 30°C during 30 min with a TurboVap® LV Evaporator (Zymark, Sotax AG, Nordring, Switzerland). The solid residue was resuspended in 1 and 2 mL of HPLC eluent for leaves and roots respectively. As for DMPP, to test the recovery rate of DMPSA after the extraction we doped leaf extracts with 5 ppm DMPSA and we recovered the 95 ± 5% of the applied DMPSA.

1.2.4. DMPP and DMPSA determination

DMPP and DMPSA were quantified by HPLC (Waters 2690 separation module with a Waters 2487 dual λ absorbance detector) using a 5 μ m; 25 cm x 4 mm Tracer Excel column and a TR-C-160-1 pre-column (Teknokroma, Sant Cugat del Vallés, Spain). Highly pure (99.9% purity) DMPP and DMPSA were kindly supplied by the manufacturer (EuroChem Agro Iberia SL, Barcelona, Spain) and DMP standards (97% purity) were obtained from Aldrich (Merck). HPLC eluent

contained 788 mL of phosphate buffer (1 mM H_3PO_4 , 5 mM KH_2PO_4 pH 3.3) and 212 mL methanol. Calibration curve was done with serial dilutions of each compound ranging from 0.1 to 100 ppm. The quantification was done using Millenium 32 version 4.00 software (Waters SAS, Saint-Quentin, France). A chromatogram showing the peaks detected with standards DMPP and DMPSA solutions is shown in Figure 1. In Figure 1A, the first peak corresponds to DMP, since DMPP in solution dissociates as $\text{DMP} + \text{Pi}$ and the second and third peaks correspond to 2,3 DMPSA and 3,4 DMPSA which do not dissociate in solution. Indeed, we did not detect free succinic acid in DMPSA solutions (Figure S1). To do so, we tried to determine succinic acid in DMPSA solutions by ionic chromatography (940 Professional IC Vario 2, Metrohm, Herisau, Switzerland) using a conductivity detector and a column Metrosep A Supp16 150/4.0 (Metrohm, Herisau, Switzerland). Elution was done by applying a gradient of water and 20 mM Na_2CO_3 in 2.5 mM NaOH at a rate of 1 mL/min at 55°C.

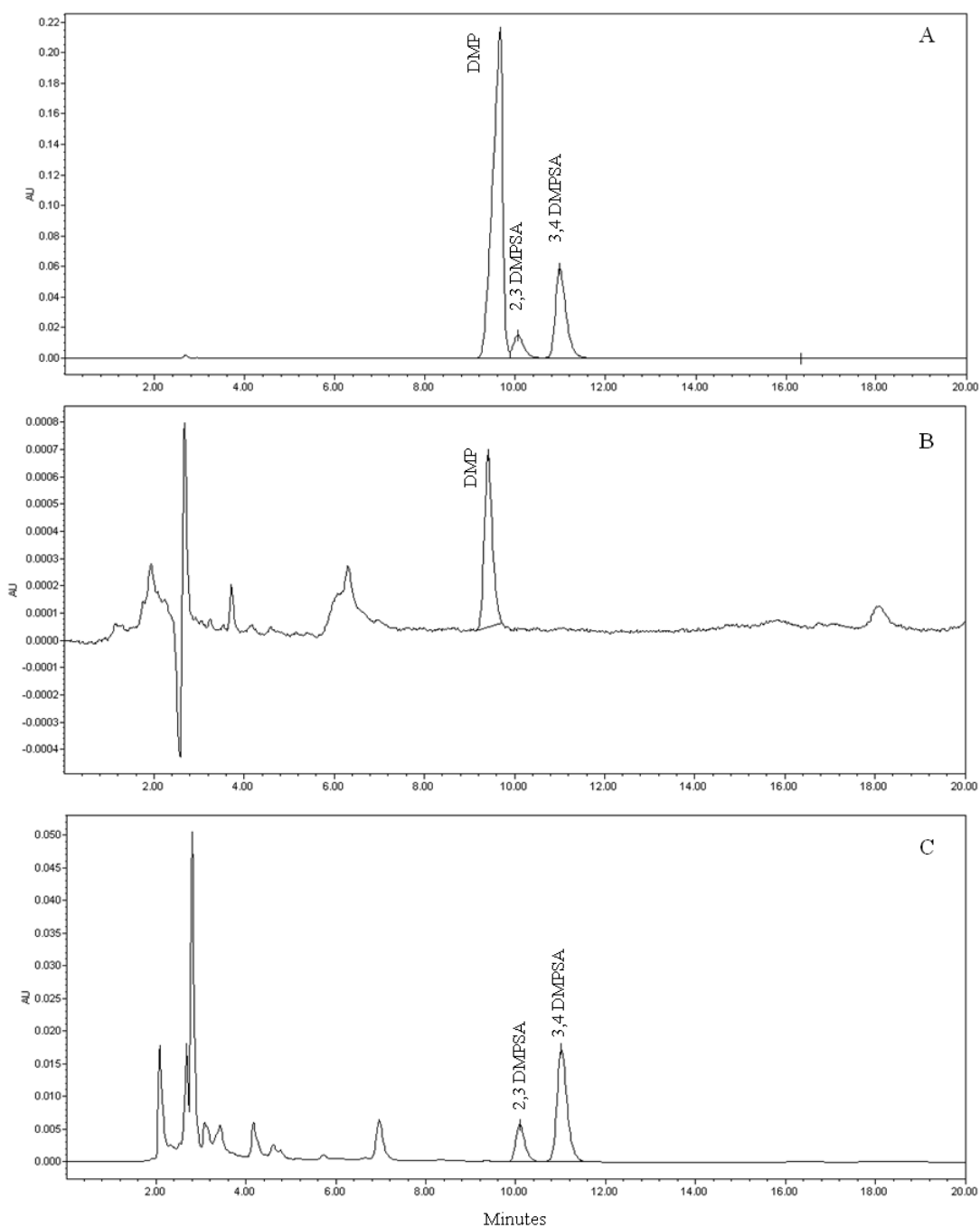


Figure 1. HPLC chromatogram of DMP and DMPSA (2,3 DMPSA and 3,4 DMPSA) in a standard solution (A), chromatogram of vegetal tissue of plants grown with DMP (B) and chromatogram of vegetal tissue of plants grown with DMPSA (C).

1.2.5. Germination toxicity test

We assayed DMPP and DMPSA effect on germination in three species: lettuce (*Lactuca sativa* var. *Batavia Rubia Munguia*) and watercress (*Lepidium sativum* var. *Alenois*), species that display high sensitivity to contaminants and commonly used as markers in toxicity tests (Gariglio et al., 2002; Zucconi et al., 1981), and red clover (*Trifolium incarnatum* L.) species chosen representative of grassland crops and previously used for nitrification inhibitors toxicity tests (Macadam et al., 2003). Ten seeds per species were incubated in 9.2 cm diameter Petri dishes containing a filter paper moistened with 10 mL of solutions of DMPP and DMPSA in deionized water (0, 1, 10 and 100 ppm) with a pH of 6. A total of five Petri dishes were analyzed per species and treatment. After seven days of incubation in the dark at 28°C the percentage of germinated seeds was determined.

1.2.6. Bioassay of toxicity with *Vibrio fischeri*

The “*Vibrio fischeri* test” is a standard bioassay used to evaluate the potential toxicity of a certain chemical compound. The assay was performed monitoring the luminiscence emitted by *V. fischeri*, indicator of its respiration and metabolism (Junges et al., 2013) using the commercial BioFix® Lumi luminous bacteria toxicity test systems (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the recommendations of the manufacturer. Briefly, bacterial suspensions were incubated with DMPP and DMPSA from 0.5 to 100 ppm. Incubations with sucrose (5-300 ppm) and zinc sulfate (0.5-30 ppm) were performed as negative and positive controls, respectively. The luminescence was determined 10 minutes after the application of the compound with a microplate reader (Biotek Synergy HT; BioTek, Winooski, Vermont). The results obtained were used to calculate the EC₅₀ index for each molecule.

1.2.7. Statistical analysis

All data in figures are reported mean \pm standard error. The homogeneity of variances was tested using Fisher's test after checking normality with Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA with Duncan's pos hoc test.

1.3. RESULTS AND DISCUSSION

Today, there is an increasing concern about the unwanted or even toxic effects that NIs may have. For instance, the recent discovery of traces of DCD in milk of New Zealand origin exported to China, probably due to cows feeding in DCD-treated grasslands, where the inhibitor accumulated in the leaves. This accumulation could be due to foliar application or to root uptake and posterior translocation to their aerial parts. This fact, warned about the need to better understand the dynamics of NIs in agricultural systems, among others in order to prevent their entry into the food chain. In this regard, in several works the capacity of plant roots to take up DCD has been reported (Marsden et al., 2015; Pal et al., 2016; Vilsmeier et al., 1991). Moreover, in the work of Pal et al. (2016) they also showed the capacity of leaves to directly take up DCD following its spray application. Besides, the fact that plants are unable to metabolize the absorbed DCD increases the possibility of its entry into the food chain. Regarding, DMP-based NIs, to our knowledge there is no report having studied plants capacity to take up DMP-based NIs.

1.3.1. Do DMPP and DMPSA cause phytotoxicity in plants grown in hydroponics?

To address this question, we grew red clover (*T. incarnatum*) plants hydroponically and we exposed them during one week to different doses of DMPP or DMPSA. To calculate an adequate inhibitor amount, we considered the equivalent to an intensive fertilization with 180 kg N ha⁻¹ as ENTEC (EuroChem Agro Iberia SL, Barcelona, Spain) which contains 0.8% of DMPP per applied ammonium N and we estimated a penetration of the product in 20 cm of soil. With a relatively standard soil density of 1.4 kg/dm³, then the inhibitor amount would be 0.51 ppm. Similarly, Tindaon et al. (2012) considering fertilization with 90 kg N ha⁻¹ calculated a dose of 0.36 ppm DMPP. Therefore, we can estimate that if DMPP and DMPSA do not persist in the soil from one crop to the next one, the plants would be hardly exposed to an inhibitor amount higher than 0.5 ppm.

Red clover was chosen as a representative species of grassland ecosystems. Plants exposed to 0.5, 1 and 10 ppm DMPP did not show any visual toxicity symptoms and DMPP did not affect root or shoot biomass (Table 1). However,

when plants were in presence of 100 ppm DMPP shoot biomass was significantly lower than that of control plant (Table 1). Moreover, necrotic symptoms, mainly in leaf edges, were evident in plants subjected to 100 ppm DMPP (Figure 2). Interestingly, despite both molecules being very similar, DMPSA did not provoke any visual phytotoxicity symptoms and biomass was not significantly different from control plants regardless the dose of the inhibitor (Figure 2; Table 1). In any case, it is very improbable that the extremely high inhibitor amount provoking DMPP phytotoxicity could be found in agricultural conditions. Thus, these results evidence that both inhibitors are not phytotoxic.

Table 1. Biomass of clover plants (shoot and root) exposed during one week to different concentrations of the nitrification inhibitors DMPP and DMPSA. Each value represents mean \pm SE (n=10) expressed as g dry weight per plant. Different letters mean significant differences between inhibitor doses for a given compound and tissue ($P < 0.05$).

Treatment	Organ	Inhibitor dose				
		0 ppm	0.5 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
DMPP	Shoot	0.29 \pm 0.03 a	0.34 \pm 0.04 a	0.37 \pm 0.02 a	0.28 \pm 0.04 a	0.22 \pm 0.02 b
	Root	0.08 \pm 0.01 a	0.08 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.04 a	0.08 \pm 0.04 a	0.06 \pm 0.03 a
DMPSA	Shoot	0.29 \pm 0.03 a	0.33 \pm 0.06 a	0.27 \pm 0.04 a	0.27 \pm 0.04 a	0.36 \pm 0.03 a
	Root	0.08 \pm 0.01 a	0.08 \pm 0.02 a	0.08 \pm 0.01 a	0.09 \pm 0.02 a	0.10 \pm 0.01 a

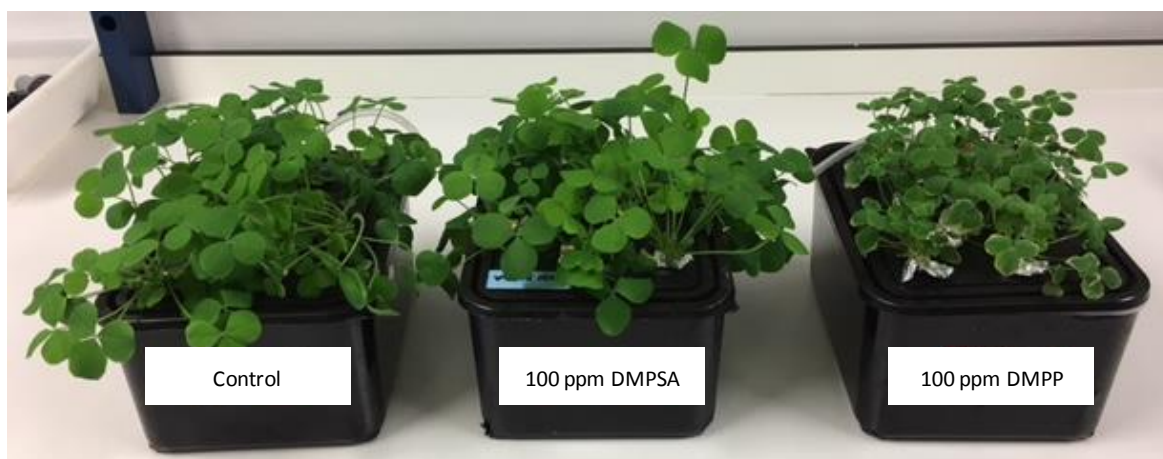


Figure 2. Clover plants grown in hydroponic conditions and exposed under to a concentration of 100 ppm DMPP or DMPSA during 7 days.

Due to the higher DCD application rate (ten times higher than DMPP), DCD it is overall known to provoke more side effects for plant performance than DMPP (Yang et al., 2016). For instance, different works have reported phytotoxicity symptoms in plants when exposed to DCD such as Wissemeier et al. (2001) and Zerulla et al. (2001) in lettuce by the application of 1.1 and 8 times the working dose of DCD. Similarly, Macadam et al. (2003) also observed chlorosis and necrosis at the edge of clover (*Trifolium repens*) exposed to two times the working dose of DCD. In contrast, Zerulla et al. (2001) and Macadam et al. (2003) did not observe any toxicity effect on lettuce after the application of 8 and 2-fold the DMPP recommended application rate, respectively. Nevertheless, other works reported slight toxicity symptoms at lower concentrations such as Wissemeier et al. (2001) which observed an increase in lettuce leaf edge necrosis compared to control plants after applying 2.6 times the standard application rate for DMPP. Regarding DMPSA, since it is still a non-commercial NI, this is to our knowledge the first work aiming to evaluate its potential phytotoxicity.

1.3.2. Quantification of DMPP and DMPSA in clover

To quantify the capacity of the plants to take up DMP-based NIs we have adapted the method described in Benckiser et al. (2013) for DMPP extraction from plant tissues. For DMPSA we have developed a new methodology as described in materials and methods. The molecules extracted from plant tissues were then

quantified by HPLC. In Table 2, we show the content of DMP, 2,3-DMPSA and 3,4-DMPSA determined in roots and shoots, indicating that these compounds can be taken up by the root and translocated to the aerial part of the plant. None of the inhibitors was detected in the plants under the lowest dose tested (0.5 ppm; Table 2). The presence of DMP was detected in plants exposed to a minimum of 1 ppm DMPP; in contrast, DMPSA was only detected with 10 and 100 ppm doses. Furthermore, the two isomers that constitute DMPSA are found in the plant tissues and their proportion is similar to that of the commercial formulation (20:80 for 2,3-DMPSA:3,4-DMPSA), discarding therefore plant preference to take up any of the isomers (Table 2). Interestingly, no DMP was found in DMPSA treated plants indicating that plants do not possess the capacity to break the bound between DMP and succinic acid.

Table 2. DMPP and DMPSA (2,3-DMPSA and 3,4-DMPSA) nitrification inhibitors content in clover plants tissues. Each value represent mean \pm SE (n=5). Inhibitor content is expressed as μmol per gram of dry weight. Different letters mean significant differences between inhibitor doses for a given compound and tissue ($P < 0.05$). "n.d." means not detected.

Treatment	Compound	Organ	Inhibitor dose				
			0 ppm	0.5 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
DMPP	DMP	Shoot	n.d.	n.d.	0.033 ± 0.018 c	0.59 ± 0.04 b	10.67 ± 0.54 a
		Root	n.d.	n.d.	0.005 ± 0.002 c	0.32 ± 0.03 b	6.18 ± 0.45 a
DMPSA	2,3 DMPSA	Shoot	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.12 ± 0.02 a
		Root	n.d.	n.d.	n.d.	0.37 ± 0.04 b	5.74 ± 0.90 a
	3,4 DMPSA	Shoot	n.d.	n.d.	n.d.	0.01 ± 0.00 b	1.09 ± 0.09 a
		Root	n.d.	n.d.	n.d.	1.43 ± 0.31 b	15.94 ± 2.66 a

In general, DMPSA accumulated in higher quantity than DMP. For instance, at 10 ppm the total amount of DMPSA found in the plant was nearly the double of the quantity of DMP in plants exposed to DMPP. These results indicate that the presence of the succinic group bound to DMP somehow facilitates the uptake of the molecule by the root (Table 2). Regarding their translocation capacity, between 63 to 86% of the taken up DMPP was present in the aerial part. In contrast, in plants exposed of DMPSA only 0.5% of the total amount was present

in the shoot at 10 ppm and 5% at 100 ppm. Therefore, although the total amount of DMPSA was higher than that of DMPP, the content of DMPP in the shoots was around 63 times higher than DMPSA at 10 ppm and around 9 times higher at 100 ppm (Table 2). Moreover, this higher accumulation of inhibitor in the aerial part is surely responsible of the visual toxicity symptoms and effect in plant growth exclusively observed in plants treated with 100 ppm DMPP. Marsden et al. (2015), using ^{14}C -DCD compared the capacity of wheat plants to take up DCD from soil (0.01, 0.1 and 1 mM DCD) and from a sterile hydroponic solution observing that uptake rate was ten times higher in sterile hydroponic solution probably because of the absence of competing physical and biological soil processes. Similarly, the shoot translocation capacity was higher in sterile hydroponic solution but only at the highest concentration tested (1 mM DCD). Other works have also reported the capacity of plants to absorb and translocate the urease inhibitor NBPT, which indeed provoked a negative impact on plant metabolism (Cruchaga et al., 2013). As for DCD, NBPT and many other xenobiotic, how DMPP and DMPSA are absorbed is completely unknown and thus, exploring the mechanisms involved will be an interesting task for future works. Interestingly, the differential capacity of plants to absorb and translocate DMPP and DMPSA suggest that both molecules are taken up by different transporters and thus, indicate an important impact of the presence of succinate for its transport. Additionally, there is no evidence that plants possess the metabolic machinery to degrade DMP-based NIs. The overall data, demonstrate that plants have the capability to take up, translocate and accumulate DMPP and DMPSA, and thus this capacity should be considered in order to monitor crops quality in fields where the combination of fertilizer with DMP-based NIs is continuously used.

1.3.3. DMPP and DMPSA do not affect seed germination

An essential quality for optimal NIs is that they do not degrade too rapidly so they can perform their nitrification inhibitor action at the same time that they do not affect other processes and organisms. Moreover, ideally, they should not persist too long to avoid its possible accumulation due to successive applications. DMPP has been described to be more stable in soil than DCD. For example, Weiske et al. (2001) observed that DCD diminished within three months after its application

and completely disappeared at the end of the growing season whilst DMPP only decreased within five months. Indeed, although DMPP application dose is ten times lower than that of DCD, at the end of the growing season they reported 6 to 16% of the originally applied DMPP (Weiske et al., 2001). Both DCD and DMPP have similar efficiency inhibiting nitrification but the fact that this is achieved by DMPP at lower concentration is thought to be due, among others, to the lower mobility of DMPP due to its greater sorption in soil particles (Wissemeier et al., 2001; Zerulla et al., 2001). However, more recently Marsden et al. (2016) suggested that their differential efficiency should be more related to their differential uptake by soil microorganism rather than to their differential mobility. In general, the persistence of NIs in the soil could potentially affect seeds germination. Bremner and Krogmeier (1989) studied the effect of 19 different nitrification inhibitors on the germination in soil of different plant species, among them DCD and nitrapyrin. They reported no effect of DCD on seed germination, while nitrapyrin affected germination but only when applied at more than one hundred times the usually applied rate.

In the present work, to further explore the potential phytotoxicity of DMPP and DMPSA we assessed whether they could be affecting seeds germination in three species: lettuce (*Lactuca sativa*) and watercress (*Lepidium sativum*), which are considered as reference species in toxicology assays because of their high sensitivity to xenobiotic and clover, also used in the previous experiment as representative of grassland species. In this case we assayed three inhibitor doses: 1, 10 and 100 ppm (Table 3). DMPSA did not provoke any effect on germination regardless the species and the dose of the inhibitor. DMPP when applied at 100 ppm greatly reduced the germination of lettuce ($18 \pm 6 \%$). Clover and watercress appeared to be more resistant and no significant effect of DMPP on germination was observed (Table 3). Therefore, in view of the results we could discard any potential effect of DMP-based NIs in field conditions since it is virtually impossible that DMPP reaches such high amounts in agricultural soils.

Table 3. Effect of different doses of nitrification inhibitors (DMPP and DMP SA) in the germination of lettuce, watercress and clover plants. Each value represent mean \pm SE (n=5) expressed as % of germinated seeds. Different letters mean significant differences between inhibitor doses for a given compound and species ($P < 0.05$).

Species	Treatment	Inhibitor dose			
		0 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Lettuce	DMPP	94 \pm 4 a	95 \pm 3 a	94 \pm 4a	18 \pm 7 b
	DMP SA		94 \pm 4 a	98 \pm 2 a	90 \pm 4 a
Watercress	DMPP	90 \pm 3 a	85 \pm 5 a	94 \pm 6 a	84 \pm 5 a
	DMP SA		98 \pm 2 a	94 \pm 4 a	98 \pm 2 a
Clover	DMPP	95 \pm 3 a	85 \pm 3 a	92 \pm 2 a	98 \pm 3 a
	DMP SA		95 \pm 3 a	94 \pm 1 a	92 \pm 4 a

1.3.4. Ecotoxicity assay of DMPP and DMP SA on *Vibrio fischeri*

DMPP is considered very specific targeting nitrifying bacteria, since generally no effect is observed in nitrifying archaea (Kong et al., 2016; Ruser and Schulz, 2015). Tindaon et al. (2012) assayed the possible effect of DMPP on non-target organisms by determining dehydrogenase activity (DHA) in soil, recommended when assaying the possible side effects of pollutants in soil, and dimethyl sulfoxide reductase activity which is widespread in soil bacteria and also useful to monitor microbial activity. The results obtained confirmed the absence of deleterious effect of DMPP on soil microbial activity since ED50 values for these enzymes activities were found only with the application of around 200 to 300 μ g DMPP per gram dry soil. Kong et al. (2016) found similar results determining soil respiratory activities (DHA, fluorescein diacetate hydrolysis) in soils treated with a maximum of 23.2 μ g DMPP per gram dry soil. In contrast, other works have reported DMPP effect on non-target microbial communities, such as Barrena et al. (2017) who in a soil incubation study reported a potential effect of DMPP stimulating denitrifying bacterial populations.

Ecophysiological tests have been also performed with DMPP fed to rats showed acute toxic effects only when 5.5 mg/L during 4 hours have been inhaled (LC50) and fishes (*Brachydanio rerio*), water fleas (*Daphnia magna*), algae (*Scenedesmus subspicatus*) (LC/EC50), and typical heterotrophic soil and water bacteria (*Pseudomonas putida*) (EC50) died first with exposure to DMPP at doses higher than 100 ppm during 96 h, higher than 100 ppm during 48 h, 67.7 ppm during 72 h and 231 ppm during 170 h respectively (Andreae, 1999 cited in Benckiser et al. 2013). Regarding DMPSA, to our knowledge, no ecophysiological assays have been performed.

To complete our study about the potential toxicity effects that DMPP and DMPSA might have, we also assayed their effect on a non-target microorganism, the aquatic gram-negative bacterium *Vibrio fischeri*, which is a bioluminescent bacteria commonly used for ecotoxicity tests. To do so, we applied different doses of DMPP and DMPSA and determined the bioluminescence of the bacteria after ten minutes of the inhibitor application (Figure 3). With the data obtained we calculated their EC50 value, which was 16.6 and 11.1 ppm for DMPP and DMPSA, respectively (Figure 2). We used sucrose as negative control, obtaining an EC50 value of 0 and zinc sulfate as positive control, obtaining an EC50 value of 5.6 ppm. These values would classify both DMPP and DMPSA as harmful substances for aquatic organisms. However, DMPP is considered as a low-mobile substance in the soil (Marsden et al., 2015) and thus it is extremely improbable that it could be leached to a rate that will provoke any effect in freshwater biota.

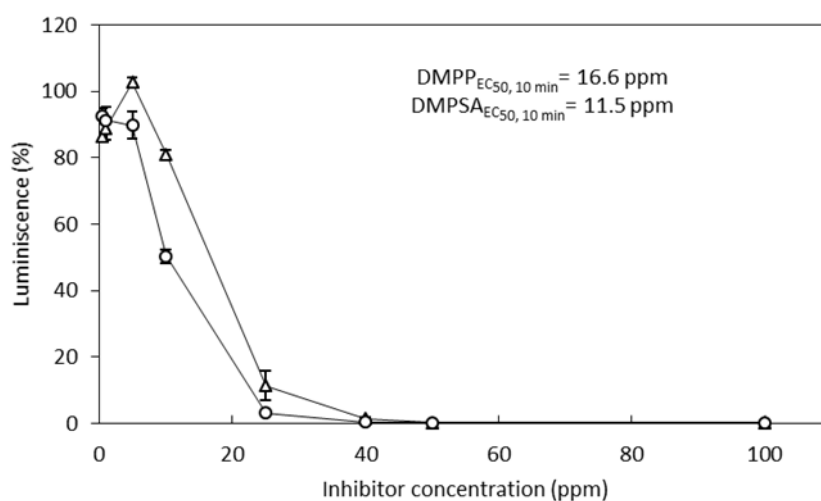
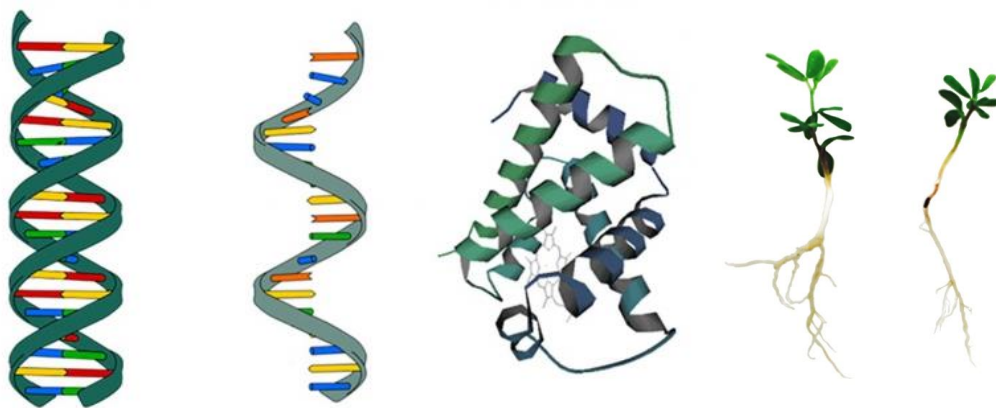


Figure 3. Percentage of luminescence of *Vibrio fischeri* 10 minutes after incubation with different concentrations (0.5, 1, 5, 10, 25, 40, 50, 100 ppm) of the nitrification inhibitors DMPP (Δ) and DMPA (\circ).

1.4. CONCLUSION

In this work we developed a reliable methodology to extract DMPP and DMPSA from plant tissues. With this method we assessed the capacity of clover plants to take up DMP-based NIs. When nitrification inhibitors were applied at high doses, DMPP was absorbed and translocated; thus, it preferentially accumulated in the leaves. In contrast, DMPSA mostly remained at the root level. Both *in planta* toxicity assays (hydroponic clover growth and germination assays) and *V. fischeri* test only showed detrimental effects at very high doses, which are nearly impossible to be found in agricultural conditions. Indeed, DMPSA appeared to be innocuous for plants even at 100 mg/L. In any case, our findings persuade of the potential need to monitor DMP-based NIs accumulation in plant edible parts were these inhibitors are continuously used.



CAPÍTULO 2

Estudio transcriptómico, proteómico y fisiológico del efecto de los inhibidores de la nitrificación basados en dimetilpirazol en plantas de *Lotus japonicus*

2.1. INTRODUCCIÓN

El empleo de inhibidores de la nitrificación (IN) en la agricultura está considerada una estrategia para reducir las pérdidas de N, bien vía lixiviado de nitratos o emisiones gaseosas de óxidos de N, y mejorar la eficiencia de uso de N (NUE) de los agroecosistemas (Marsden et al., 2015).

Los IN se añaden a los fertilizantes de base amoniacal: y si bien hay abundantes estudios sobre el efecto ambiental de los mismos (Menéndez, et al., 2012; Abalos et al., 2014), es muy escasa la bibliografía que recoge el posible efecto que estas moléculas puedan tener sobre los procesos fisiológicos de la planta (Reeves et al., 1988). Macadam et al. (2003) estudiaron el efecto que el DCD en plantas de trébol, observando síntomas de toxicidad después de 21 días; asimismo Zerulla et al. (2001) en plantas de lechuga tratadas con DCD también observaron síntomas fitotóxicos después de la aplicación del inhibidor. Nuestro grupo de investigación en un estudio reciente (Rodrigues et al., 2018) y que forma parte del Capítulo 1 de esta tesis observó síntomas de toxicidad en plantas de trébol expuestas a dosis de 100 mg DMPP L⁻¹ posiblemente como consecuencia de la translocación desde la raíz a la parte aérea de la planta de estos inhibidores.

Hasta la fecha se ha propuesto que el DMPP inhibe la actividad de la enzima amonio monooxigenasa (AMO) de bacterias nitrificantes (Barrena et al., 2017) sin estar aún dilucidado su mecanismo de acción.

Las técnicas aplicadas de la biología molecular han permitido descubrir y analizar los procesos moleculares y celulares, facilitando una mejor comprensión de las funciones que regulan el crecimiento y la tolerancia a los estreses ambientales de las plantas (Mochida y Shinozaki, 2010). Las “ómicas”, como son denominadas el conjunto de técnicas moleculares basadas en el análisis de un gran volumen de datos, se valen de la bioinformática y de técnicas rápidas y automatizadas de alto rendimiento (high-throughput techniques), destacando entre las más importantes: la genómica (estudia el genoma y la función de los genes), la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica (estudia los metabolitos y productos metabólicos).

La transcriptómica estudia el mRNA y su expresión génica en una célula, tejido u órgano, siendo sus resultados muy variables, ya que muestran qué genes se

están expresando en un momento dado. Esta técnica consiste en analizar el transcriptoma (moléculas de RNA) mediante *microarray* (micromatrices) de DNA, o sea, construir sobre una membrana o lámina de vidrio, arreglos de muestras que contienen fragmentos de DNA. Por otro lado, se marca el RNA o el DNA copia (cDNA) de una población celular con fluorescencia o radioactividad, y se usa esta preparación para hibridar con el DNA de la micromatriz. Generalmente se hibrida simultáneamente la misma micromatriz con una muestra de RNA o DNA copia de referencia, para facilitar la comparación (Lowe et al., 2017).

Por otro lado, la proteómica, estudia a gran escala las proteínas, en particular su estructura y función, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. Para su despegue definitivo fue necesaria la consolidación de la espectrometría de masas como técnica aplicada al análisis de moléculas biológicas y el crecimiento exponencial en el número de entradas correspondientes a genes y/o proteínas en las bases de datos, combinándolo con potentes métodos de fraccionamiento y separación de péptidos y proteínas como la electroforesis de poliacrilamida de dos dimensiones (2D-PAGE) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Graves y Haystead, 2002).

Por lo tanto, el uso de herramientas moleculares como la transcriptómica y la proteómica, apoyados con estudios fisiológicos, pueden ser de gran ayuda en la identificación de los genes y proteínas de respuesta a los inhibidores de la nitrificación permitiendo así tener un mayor y mejor conocimiento de los mecanismos que podrían estar afectados por estos productos.

2.2. OBJETIVO

Para estudiar las causas que dan lugar a la potencial toxicidad del DMPP, en este capítulo se han utilizado técnicas moleculares como son, la transcriptómica y la proteómica, que estudian la expresión génica y la abundancia de proteínas, respectivamente, para conocer los cambios a nivel molecular que la presencia del DMPP produce en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. Estos estudios han sido complementados con medidas fisiológicas que a la luz de las “ómicas” podrían ser los causantes de la fitotoxicidad.

La información que se genere será de gran importancia para conocer el efecto que la potencial acumulación indeseable de los inhibidores de la nitrificación en los tejidos vegetales puede provocar en la fisiología de las plantas.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Material vegetal

Lotus japonicus (Lotus) pertenece a la familia de las Leguminosas (Fabaceae), es una planta auto fértil, dicotiledónea, presenta un genoma relativamente pequeño (alrededor de 450 Mbp) en base a 12 cromosomas. Posee un ciclo de vida de 2-3 meses, de muy fácil cultivo y producción de semillas. Debido a sus características fisiológicas, genéticas, tales como un genoma relativamente pequeño, tiempos de generación cortos, el tamaño más bien pequeño de la planta, la cantidad abundante de flores, su carácter de autógama, y la existencia de distintas herramientas genéticas y moleculares ha sido propuesta como planta modelo (Handberg y Stougaard, 1992; Márquez et al., 2005; Sato y Tabata, 2006; Sato et al., 2008).

Según Días et al. (2005) la gran importancia agronómica del género *Lotus* se basa en algunas especies utilizadas en sistemas pastoriles como forrajeras de alta producción, incluyendo aquellos que se encuentran sujetos a condiciones ambientales y edáficas extremas.

Es una especie que puede utilizar tanto nitrato como amonio como fuentes externas de nitrógeno inorgánico, o bien, utilizar N₂ atmosférico a través de la simbiosis con *Mesorhizobium loti*. Lotus es una planta de climas fríos y templados que muestran altos niveles de actividad nitrato reductasa en raíces (Woodall y Forde, 1996).

2.3.2. Crecimiento de plantas de Lotus

Las semillas de Lotus se escarificaron con papel de lija de 0,5 mm durante 10 min para favorecer su germinación; a continuación, se lavaron y se dejaron agitando en agua desionizada durante 24 h. Al cabo de las 24 horas, las semillas se pusieron a germinar en una mezcla de perlita: vermiculita (1:2) durante 7 días, siendo regadas cada 48 h con agua desionizada. Una vez germinadas, las plántulas se transfirieron a un sistema de cultivo hidropónico puro en recipientes de 3 L de volumen con 10 plantas por recipiente. A continuación, se colocaron en una cámara de cultivo con ambiente controlado estableciéndose un

fotoperíodo de 12/12 h luz/oscuridad, una temperatura de 22/16 °C día/noche, una humedad relativa de 60-70% y una intensidad luminosa de 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Las plantas crecieron en cultivo hidropónico durante 3 semanas, renovándose la solución nutritiva semanalmente. La solución nutritiva utilizada fue de Rigaud y Puppo modificada (1975) (5 mM NO_3NH_4 ; 1,15 mM K_2HPO_4 ; 2,68 mM KCl; 0,7 mM CaSO_4 ; 0,07 mM $\text{Na}_2\text{Fe-EDTA}$; 0,85 mM MgSO_4 ; 16,5 μM Na_2MoO_4 ; 3,7 μM FeCl_3 ; 3,4 μM ZnSO_4 ; 16 μM H_3BO_3 ; 0,5 μM MnSO_4 ; 0,1 μM CuSO_4 ; 0,2 μM AlCl_3 ; 0,1 μM NiCl_2 ; 0,06 μM KI.). El pH de la solución se mantuvo constante entre 6 y 6,5 realizando ajustes cada dos días con NaOH y HCl. En la cuarta semana, coincidiendo con la renovación de la solución nutritiva, se añadió los inhibidores de la nitrificación, 3,4-dimetilpirazol fosfato (DMPP) y 3,4-dimetil pirazol ácido succínico (DMP SA) aplicando los siguientes tratamientos: control (0 mg L^{-1}), 1 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} y 100 mg L^{-1} que se mantuvieron durante una semana. La dosis del inhibidor para la solución de cultivo se calculó según la recomendación comercial que es un 0,8% del nitrógeno total aplicado. Dado que en la solución contenía 5 mM NO_3NH_4 , esta dosis corresponde a aproximadamente a 1 mg L^{-1} (p/v). Esta dosis recomendada coincide con la concentración que se encontraría en la solución de suelo si se aplicase una dosis de fertilizante de 180 kg N ha^{-1} con la dosis de inhibidor comercial (de un 0,8% de nitrógeno total aplicado), asumiendo los 20 primeros cm de suelo y una densidad aparente del suelo de 1,4 kg/dm^3 , en un suelo característico de la península ibérica. Después de una semana de tratamiento, las plantas se cosecharon, una parte se usaron para determinar crecimiento, calculando el peso seco de parte aérea y raíz, tras secar el material en una estufa a 70 °C durante 48 h. Otra parte de las plantas se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, parte aérea y raíz por separado y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis. Después del estudio proteómico, transcriptómico y determinaciones fisiológicas pusimos plantas de Lotus con un tratamiento más prolongado con DMPP (15 días), con dosis de 0 mg L^{-1} y 100 mg L^{-1} del inhibidor para ver si detectábamos modificaciones en el crecimiento de las plantas o mayores efectos de toxicidad.

2.3.3. Determinación y cuantificación de DMPP y DMPsa en tejidos de plantas de Lotus

La extracción y determinación de los contenidos de DMPP y DMPsa en plantas de Lotus se realizó según se describe en Rodrigues et al. (2018). Se mantuvo las proporciones de peso: volumen para la extracción de los inhibidores tanto para raíz como para parte aérea. El contenido del inhibidor DMPP en los tejidos fue cuantificado en un equipo HPLC Waters 2690 equipado con un detector 2487 dual de absorbancia, utilizando una columna Tracer Excel de 5 μ m; 25 cm x 4 mm) (Teknokroma), una pre-columna TR-C-160-1 (Teknokroma). La cuantificación fue realizada utilizando el software Millenium 32 version 4.00 software (Waters SAS, Saint-Quentin, France). El contenido de los inhibidores fue expresado en μ gramos de inhibidor por g de peso seco de tejido.

2.3.4. Análisis transcriptómico

2.3.4.1. Preparación de las muestras y extracción de RNA

El análisis transcriptómico se realizó en la parte aérea de las plantas control y las crecidas con la dosis de 10 mg de DMPP L⁻¹. Para la extracción de RNA, se utilizaron 100 mg de parte aérea y se realizaron cuatro repeticiones biológicas independientes, cada réplica biológica estaba constituida por cinco plantas cultivadas en el mismo recipiente.

El RNA total se aisló de la parte aérea de plantas cosechadas, molidas con N₂ líquido y almacenadas a -80 °C utilizando el protocolo modificado de Kistner y Matamoros (2005). El tampón de extracción de RNA se preparó inmediatamente antes de la extracción, el cual contenía un 2% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (diluido a partir de una solución madre estéril al 10% de CTAB en agua Milli-Q tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC)), Polivinilpirrolidona de peso molecular medio de 40 kDa (PVP40) al 2%, 100 mM de tampón Tris-HCl a pH 8 (diluido de una solución madre al 1 M con agua Milli-Q tratada con DEPC), 25 mM de EDTA a pH 8 (diluido de una solución madre al 5 M con agua Milli-Q tratada con DEPC) y 2% β -mercaptoetanol. El tampón se precalentó a 65 °C antes de uso.

Las muestras fueron transferidas a un tubo eppendorf de 2 ml añadiéndose 600 μ l de tampón de extracción de RNA precalentado, se mezcló con un vórtex

durante un minuto, luego se añadieron 600 µl de una mezcla de fenol:cloroformo:alcoholisoamílico (25:24:1, pH 8) y se mezclaron agitando durante 10 minutos a 55 °C. Las diferentes fases se separaron por centrifugación a 12.000 g durante 10 min a temperatura ambiente. La fase superior se recogió, se transfirió a un nuevo tubo y se extrajo de nuevo con un volumen de fenol:cloroformo:alcoholisoamílico. Después de la centrifugación, la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se añadió un volumen de LiCl₂ 4 M para tener una concentración final de 2 M. El RNA se precipitó durante 1 hora a -20 °C y se recogió por centrifugación a 14.000 g y 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se descartó y el RNA sedimentado se lavó una vez con LiCl₂ 2M frío y dos veces con etanol frío al 80%. El RNA sedimentado se dejó secar en una campana estéril y enseguida se resuspendió en 50 µl de agua libre de RNAsa (Sigma-Aldrich). La verificación de la integridad y concentración de las preparaciones de RNA se realizó con un bioanalizador Experion (Bio-Rad) con chips RNA StdSens y Nano-Drop 2000 (Nano-Drop Technologies), respectivamente.

2.3.4.2. Hibridación de los microarrays y análisis de datos

Los microarrays fueron diseñados y fabricados por la empresa Bioarray utilizando la plataforma de Agilente (Agilent Technologies) y fueron desarrollados específicamente para *Lotus japonicus*. Los microarrays se hibridaron con el RNA total de la hoja de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los *microarrays* fueron escaneados, los archivos de imágenes fueron procesados y el análisis de datos fue realizado por Agilent Corporation. El método no paramétrico (Breitling et al., 2004) fue el utilizado para identificar los genes expresados diferencialmente entre el tratamiento y las condiciones de control usando un umbral de FDR de $P < 0,05$. Solo se consideraron los genes que presentaban un *fold-change* de 2 (que se inducen el doble o más o se reprimen a la mitad o más).

2.3.5. Análisis proteómico

2.3.5.1. Preparación de las muestras

El análisis proteómico se realizó igualmente en parte aérea de las plantas control y las crecidas con la dosis de 10 mg de DMPP L⁻¹. En primer lugar, se realizó una extracción de proteínas a partir de 0,1 g de PF como se describe en Marino et al. (2016). La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford.

Después de la cuantificación, se tomó una alícuota del extracto de proteína para cada muestra, se diluyó en Laemmli buffer y se cargó en un gel de poliacrilamida. El ensayo se detuvo cuando la muestra entró 3 mm en el gel de resolución, de modo que el proteoma de cada muestra fue teñido y se concentró en la interfaz de gel. El gel fue teñido con Azul de Coomassie y posteriormente se realizó la digestión de las bandas con tripsina a 37 °C durante 16 h como describen Shevchenko et al. (2006). La purificación y concentración de péptidos se realizó utilizando puntas C18 Zip Tip de extracción de fase sólida (Millipore). Previamente las muestras fueron desaladas y concentradas utilizando una pre-columna de 0,5 cm de longitud y 100 µm de diámetro interno con la misma composición química que la columna de separación. Las mezclas de péptidos contenidas en los extractos de cada muestra se separaron mediante cromatografía de fase reversa utilizando un cromatógrafo nano LC ultra 2D, con una columna de 75 µm de diámetro interno y 25 cm de longitud (Eksigent).

Los péptidos que eluyeron de la columna fueron analizados utilizando un sistema Sciex 5600 Triple-TOF. Los datos se adquirieron mediante un escaneo realizado en un rango de masas de 350 m/z hasta 1250 m/z en un tiempo de exploración de 250 ms. Se escanearon los iones producidos en intervalo de masa de 230 m/z hasta 1500 m/z y se excluyeron para una mayor fragmentación durante 15s.

2.3.5.2. Identificación de péptidos y cuantificación

Para la adquisición de los espectros de masas/masas (MS/MS) se utilizó el software Analyst 1.7.1 (AB Sciex) y los archivos de espectros se procesaron a través del software ProteinPilot v.5.0 (AB Sciex), utilizando el algoritmo Paragon v.4.0.0.0 para la búsqueda en bases de datos (Shilov et al., 2007). Para la agrupación de datos se utilizó Progroup y se realizaron búsquedas en la base de datos de referencia Proteome UniProt. La tasa de falsos positivos (FDR, *false Discovery rate*) se realizó utilizando un modelo de ajuste no lineal (Tang et al., 2008), y los datos mostrados fueron aquellos que presentaron un FDR < 1%.

La cuantificación de los péptidos se realizó utilizando el software Progenesis LC-MS (ver 2.0.5556.29015, Nonlinear Dynamics). Los análisis en el espectrómetro de masas de cada muestra fueron utilizados para alinear y compensar las variaciones ocasionadas por el sistema de separación nanoLC. La calidad de cada alineamiento se supervisó manualmente con la ayuda del software

Progenesis LC-MS. La identificación de péptidos se exportó a partir del software ProteinPilot y se importaron en el software Progenesis LC-MS donde se combinaron con las características respectivas. La salida de datos se gestionó mediante scripts R para análisis y representación estadísticos posteriores. Las proteínas identificadas basadas en una modificación, las proteínas reversas (identificadas en la base de datos *decoy*) y las potenciales contaminantes, fueron filtradas y se descartaron. Fueron consideradas proteínas con cambios de abundancia significativos aquellas cuantificadas con al menos dos péptidos únicos, un $P < 0,05$ (ANOVA) y una tasa de cambio $< 0,77$ (descenso de contenido relativo) o $> 1,3$ (aumento de contenido relativo) en escala lineal.

Para el análisis funcional se utilizó el software DAVID (Huang et al., 2009; <https://david.ncifcrf.gov/>), con el que se realizaron análisis de *Gene Ontology* acerca de los procesos biológicos y funciones moleculares.

A continuación, se describen los métodos utilizados para determinar los parámetros fisiológicos. Estos parámetros se han determinado en tejidos vegetales de las plantas control y las plantas crecidas con la dosis de 10 mg de DMPP L⁻¹.

2.3.6. Medida de la respiración radicular

La actividad respiratoria de la raíz, medida como consumo de O₂ en el tiempo a una temperatura de 21 °C, se determinó mediante electrodos tipo Clark (HansatechOxygraph, H. SaburLaborbedarf, Reutlingen), de acuerdo al método descrito por Zabalza et al. (2009). Para cada medida se utilizaron dos alícuotas de tejido de raíz de 0,05 g de PF en dos cámaras de oxígeno estrechamente cerradas que contenían 1 ml de tampón de reacción (25 mM de imidazol-HCl, pH 6,5) en agitación. Se añadieron a cada cámara 10 µl de KCN 0,01 M en HEPES 20 mM, pH 8 o 20 µl de SHAM 1 M en 2-metoxietanol, respectivamente a la cubeta. Aproximadamente 5 minutos después de la aplicación del primer inhibidor, se añadió el otro inhibidor. La Respiración Total (Rt) se determinó como la tasa de consumo de O₂ antes de la adición de cualquier inhibidor. La respiración residual (Rr) se determinó como el consumo de O₂ en presencia de ácido salicilhidroxámico (SHAM) que puede inhibir la ruta alternativa y cianuro (KCN) que puede inhibir la vía citocromica. La capacidad de la vía alternativa

(Ra) se calculó substrayendo la respiración residual (Rr) de la tasa de consumo de O₂ obtenida después de inhibir la capacidad de la vía citocrómica (Rc) con KCN, mientras que la capacidad de la vía citocrómica (Rc) se calculó de manera similar pero después de inhibir la vía alternativa con SHAM.

$$R_t = R_c + R_a + R_r$$

Para cada tratamiento se realizaron 4 medidas y la tasa de respiración se expresó en nmol O₂ g peso fresco⁻¹ min⁻¹.

2.3.7. Contenido de antioxidantes

El contenido de antioxidantes en plantas se midió por electroforesis capilar de alto rendimiento en extractos de plantas utilizando el método modificado descrito por Herrero-Martínez et al. (2000). Para la extracción se emplearon 0,2 g y 0,1 g de PF de la parte aérea y la raíz respectivamente. Las muestras se molieron en un mortero con N₂ líquido y fueron homogeneizadas con 1 ml de ácido metafosfórico al 2% (v/v) que contenía etilendiaminotetraacetato 1 mM. El homogeneizado se centrifugó a 13000 g, 4 °C durante 12 minutos y se filtró. El sobrenadante filtrado se utilizó para determinar los antioxidantes mediante electroforesis capilar usando como eluyente un tampón que contenía NaH₂PO₄ 60 mM, NaCl 60 mM (pH 7) y bromuro de hexadimetrina al 0,0001% bajo las siguientes condiciones: potencia de -15 kV, 50 µm de diámetro interno y tubo capilar de 30/40,2 cm de longitud. El contenido las formas reducidas de los antioxidantes, glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH) se detectaron a una longitud de onda de 200 nm y el ácido ascórbico (AsA) a una longitud de onda de 265 nm, utilizando un detector diodearray (DAD).

Los niveles de los antioxidantes en forma oxidada, dehidroascorbato (DHA), glutatión oxidado (GSSG) y homoglutatión oxidado (hGSSG) se estimaron como la diferencia entre el conjunto total de los antioxidantes obtenidos mediante el tratamiento de las muestras con ditioneitol (DTT) y la forma reducida de los mismos determinada previamente (Seminario et al., 2017).

2.3.8. Determinación de la peroxidación lipídica

El nivel de productos de peroxidación lipídica se midió en los tejidos vegetales (parte aérea y raíz) utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), el cual

determina los niveles de malondialdehído (MDA) como producto final del proceso de peroxidación lipídica. Se realizaron diversas modificaciones para corregir las interferencias provocadas por la turbidez no específica, complejos de ácido tiobarbitúrico-azúcar y otras sustancias reactivas al ácido no-tiobarbitúrico que absorben a 532 nm de acuerdo a lo descrito por Hodges et al. (1999) y Gil-Monreal et al. (2017).

2.3.9. Determinación de proteínas carboniladas

La extracción de proteínas para la determinación de proteínas carboniladas en las muestras de parte aérea y raíces fue realizada como se describe en el kit Oxyblot™ Protein Oxidation Detection Kit (S7150). El Western blotting se realizó de acuerdo con la técnica estándar. En este ensayo se utilizó como anticuerpo primario el Rabbit Anti-DNP (Rb X DNP) de EMD de Millipore (Billerica MA, USA), con una dilución 1:1500. El anticuerpo secundario utilizado fue Anti Rabbit IgG Alkaline Phosphatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una dilución 1:5000, y las bandas obtenidas fueron visualizadas utilizando Immun-Blot Amplified AP Assay, Bio-Rad 170 6412 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para la cuantificación de bandas se utilizó un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

2.3.10. Cuantificación de hormonas

Se realizó la cuantificación de hormonas en parte aérea de Lotus, para lo cual se utilizaron muestras de 0,2 g de peso fresco congelado en nitrógeno líquido que posteriormente fueron liofilizadas en un liofilizador (TelstarLyoQuest, Life Science Solutions, Tarrasa, España). Las muestras liofilizadas se molieron en un molino criogénico (6770 Congelador/ Molino de SPEX SamplePrep, Stanmore, Reino Unido) y se pusieron en tubos de 10 mL de politetrafluoroetileno (PTFE) (Oak Ridge CentrifugeTube, ThermoScientific, Barcelona, España). La extracción se realizó utilizando una modificación del método descrito por Pan et al. (2008; 2010). Un mL de la solución de extracción consistente en una mezcla de 2-proponal/H₂O/ HCl (2:1:0,002 v/v/v) incluyendo IDS (10 ng de BA-d₇, 20 ng de ABA-d₆, DHZ- d₅ y SA-d₆; 40 ng de Bk-d₅ y GA7-d₂) se añadió a cada tubo de PTFE. Los tubos se agitaron durante 30 min a 4 °C, posteriormente se añadió diclorometano (1,8 ml) y la mezcla se agitó nuevamente durante 30 min a 4 °C. Después de la etapa de agitación, el disolvente formó dos capas separadas por

desechos vegetales. Se recogió la capa inferior, que contenía todos los compuestos de interés. Se desechó la capa superior y del pellet resultante se volvió a extraer nuevamente siguiendo el mismo procedimiento. La capa inferior se recogió de nuevo y se combinó con la anterior. A continuación, ambas capas inferiores combinadas se concentraron con una corriente de nitrógeno en viales de vidrio de 2 ml a sequedad, almacenándose hasta su análisis a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras secas se resuspendieron en un volumen final de 200 μL de metanol al 100%. Se realizó la separación por cromatografía en columna de fase inversa (Zorbax SB-C18 2,1 x 50 mm) manteniendo la temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La determinación y cuantificación de las hormonas, ácido abscísico, ácido indolacético, ácido jasmónico, ácido salicílico, giberelinas y citoquininas totales se realizó con el software MassHunter Workstation (Agilent Technologies, Madrid, España) (Delatorre et al., 2017).

2.3.11. Pigmentos fotosintéticos

Los contenidos de clorofilas *a*, *b* y carotenoides se determinaron al término del periodo de crecimiento. Se pesó aproximadamente 0,1g de material fresco y se homogeneizó con 1 ml de metanol durante 5 minutos, después se centrifugaron a 1000 *g* durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante. Se tomó 100 μL del extracto más 100 μL de metanol y se cargó en los pocillos de una microplaca. Se midió los pigmentos fotosintéticos mediante absorbancia en un lector de microplacas (Spectra MAX 340 pc, Molecular Devices), a distintas longitudes de onda: 653 nm y 666 nm para determinar clorofila *a* y *b* respectivamente, y 470 nm para medir el contenido de carotenoides, según Hansmann (1973). Los resultados se expresaron en mg g^{-1} peso seco.

2.3.12. Determinación C, N y composición isotópica ($\delta^{15}\text{N}$)

Los porcentajes de C y N en las muestras de material vegetal se determinaron mediante un analizador elemental (CNS 2500, CE Instruments, Milán, Italia). Se pesaron en cápsulas de estaño de 1 a 3 mg de materia seca de las muestras previamente molidas, posteriormente las capsulas se sellaron y se dispusieron en el muestreador del analizador elemental, donde se oxidaron mediante una combustión Dumas, dando lugar a una mezcla de gases, N_2 , CO_2 y H_2O ; el vapor

de agua producido es retenido en una trampa de anhídrona (perclorato de magnesio anhidro) y los gases N₂ y CO₂ fueron detectados por conductividad térmica. La acetanilida se utilizó como estándar, permitiendo crear una recta de calibración y obtener así, directamente, el % N y % C en la composición másica de las muestras. La relación C/N se ha calculado a partir de los datos porcentuales de N y C.

La abundancia natural del nitrógeno o $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea y raíz de las plantas se determinó simultáneamente al contenido en C y N descrito anteriormente mediante un analizador elemental (CNS 2500, CE Instruments, Milán, Italia), este está acoplado mediante una interfaz (ConFloII, Finnigan) a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (TermoQuest Finnigan model Delta plus, Bremen, Alemania).

Las $\delta^{15}\text{N}$ se define como la diferencia relativa de la relación isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) entre una muestra dada (R_m) y un estándar internacional (R_{st}) (Tcherkez y Hodges, 2008) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\delta(\text{‰}) = \frac{R_m - R_{st}}{R_{st}} \times 1000$$

2.3.13. Extracción y determinación de ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos se extrajeron de muestras congeladas de parte aérea y raíces de plantas Lotus. Las muestras fueron trituradas en mortero con N₂ líquido (aproximadamente 0,1g de peso fresco). Se añadió una alícuota de 1,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v) en agua. Los extractos fueron centrifugados a 18.000 g y 4 °C durante 12 min; el sobrenadante se recogió para su posterior análisis. Los contenidos de malato, succinato y citrato fueron determinados por un equipo de cromatografía iónica DX-500 IC (Dionex Corporation, CA, EE. UU) compuesto por una pre-columna Dionex Ion-Pac AG11 (4x50 mm), una columna Dionex Ion-Pac AS11 (4x250 mm) y una columna supresora Dionex ASRS Ultra II (4 mm). Las muestras fueron inyectadas con un inyector automático AS40 (Dionex) a una dilución 1:20 en agua destilada mili-Q. Se aplicó un flujo de disolvente de 2 ml min⁻¹ (metanol 18% / NaOH 0,2 mM), y

se llevó a cabo la separación de ácidos orgánicos usando un gradiente de NaOH (de 0,2 mM a 35 mM) durante 16 min. La detección se llevó a cabo por el método de conductividad en el detector electroquímico.

2.3.14. Determinación de aminoácidos

Los aminoácidos se extrajeron a partir de las muestras congeladas y trituradas con N₂ líquido y posteriormente homogeneizadas con HCl 1 M. Se utilizó 0,1 g y 0,05 g de peso fresco para la parte aérea y raíces respectivamente. Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 10 minutos en hielo. Los extractos fueron centrifugados a 10.000 g y 4°C durante 10 minutos; los sobrenadantes se recogieron y se neutralizaron usando NaOH 1M. Se tomaron 100 µl de cada muestra y se derivatizaron con 1 mM de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en acetona a temperatura ambiente. El contenido de aminoácidos libres se determinó utilizando una electroforesis capilar PA-800 (BeckmanCoulter Inc., Fullerton, CA) equipada con un detector de fluorescencia inducida por láser (láser de argón a 488 nm) (Zulet et al., 2013b). Los análisis se realizaron con una columna capilar de sílice fundida de 50µm de diámetro interno y de longitud 43/53,2 cm. El método de análisis se realizó a un voltaje de 30 kV y 20 °C.

2.3.15. Determinación de proteína soluble

El contenido en proteína soluble se determinó según el método de Bradford (1976) en el extracto realizado para la determinación de proteínas carboniladas. Los extractos fueron centrifugados a 10.000 g y 4 °C durante 12 min; se recogió el sobrenadante y se realizó una dilución 1:100 para parte aérea y 1:20 para raíces previamente a la adición del reactivo de Bradford. El contenido de proteína se determinó mediante la medida de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Spectra MAX 340 pc, Molecular Devices). Se utilizó como estándar para la recta patrón seroalbúmina bovina (BSA, Sigma). Los resultados se expresaron en mg proteína g⁻¹ peso seco.

2.3.16. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media ± desviación estándar con un n = 3-10 mediciones independientes y fueron tratados mediante el programa SPSS Statistics versión 23.0 para Windows. Los resultados obtenidos en crecimiento y

contenido interno de los inhibidores se sometieron a un test de homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene después de comprobar la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos, y un análisis post hoc DUNCAN con un nivel de significación del 95%. El resultado de las pruebas post hoc se muestra en las tablas con letras que representan diferencias significativas entre las concentraciones.

Para el resto de las determinaciones de parámetros fisiológicos se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba *t de Student* con un nivel de significación del 95%. Las diferencias significativas se señalan con asterisco.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1. Acumulación de los inhibidores de la nitrificación (DMP y DMPSA) y efecto en el crecimiento de plantas de Lotus

En estudios anteriores vimos que los inhibidores de la nitrificación (IN), DMPP y DMPSA, pueden ser absorbidos por las raíces y translocados a la parte aérea de plantas trébol. Mientras que la acumulación de DMPSA no se correspondía con ningún efecto fitotóxico, para altas dosis del inhibidor, con 100 mg DMPP L⁻¹ se observó clorosis en las hojas de trébol (Rodrigues et al., 2018). Estos inhibidores de la nitrificación son compuestos que parecen actuar sobre la enzima amonio monoxigenasa de las bacterias nitrificantes (Ruser y Schulz, 2015), por lo tanto, se desconoce los posibles efectos pleiotrópicos que puedan ocasionar en las plantas.

El uso de inhibidores de la nitrificación está muy extendido en cereales y cultivos pratenses. Las leguminosas pratenses son importantes sobre todo como alimento para el ganado y materias primas para la industria (Graham et al., 2003; Udvardi et al., 2005). Entre los diversos géneros utilizados, Medicago, Trifolium y Lotus son los más frecuentes. *Lotus corniculatus* es considerada la especie de Lotus más importante agronómicamente y está muy relacionada taxonómicamente con *Lotus japonicus*, especie modelo que ofrece una serie de ventajas para los estudios genéticos (Díaz et al., 2005). Los avances en las técnicas moleculares como pueden ser la proteómica y transcriptómica nos permiten el estudio del efecto de los inhibidores de la nitrificación sobre el metabolismo de plantas para conocer los procesos celulares y moleculares de las plantas que pueden ser afectados. Esta aproximación es de interés cuando se desconoce si existe efecto alguno y de haberlo en qué proceso metabolito está localizado.

El crecimiento de plantas de Lotus crecidas con diferentes dosis de los inhibidores de la nitrificación estudiados, no presentaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, ni en la parte aérea ni en la raíz (Tabla 1). Sin embargo, pese a no existir diferencias significativas en la biomasa de las plantas entre los tratamientos, para la dosis más elevada de inhibidor DMPP (100 mg L⁻¹) sí que se pudieron observar síntomas visuales de toxicidad

consistente fundamentalmente en la presencia de clorosis y necrosis en los bordes de las hojas (Imagen 1 B).

Tabla 1. Biomasa de plantas de Lotus (parte aérea y raíces) expuesta durante una semana a diferentes concentraciones de los inhibidores de la nitrificación DMPP y DMPA. Cada valor representa la media \pm error estándar ($n = 10$) expresada como g de peso seco por planta. Diferentes letras significan diferencias significativas entre dosis de inhibidor para un compuesto y tejido dados ($P < 0.05$).

Biomasa		Dosis del IN			
		0 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹
DMPP	Parte aérea	0,14 \pm 0,02 a	0,18 \pm 0,02 a	0,18 \pm 0,04 a	0,18 \pm 0,03 a
	Raíz	0,04 \pm 0,01 a	0,04 \pm 0,01 a	0,04 \pm 0,01 a	0,04 \pm 0,01 a
DMPA	Parte aérea	0,14 \pm 0,02 a	0,19 \pm 0,02 a	0,17 \pm 0,02 a	0,18 \pm 0,02 a
	Raíz	0,04 \pm 0,01 a	0,03 \pm 0,004 a	0,03 \pm 0,004 a	0,04 \pm 0,01 a

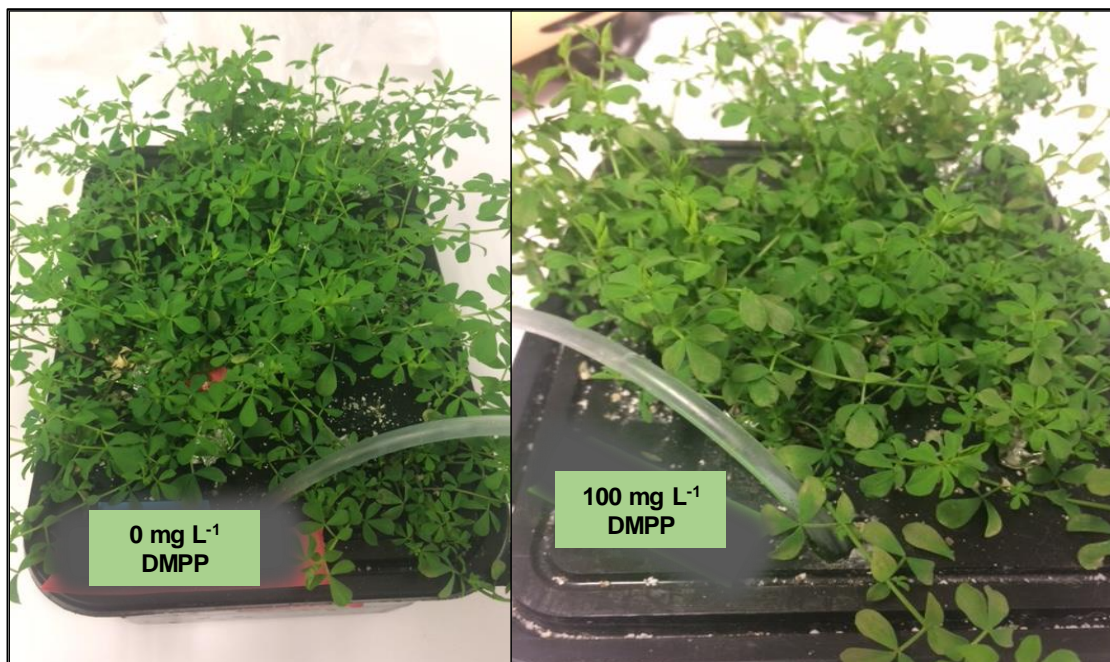


Imagen 1- Plantas de Lotus crecidas en cultivo hidropónico a una concentración de 0 mg L⁻¹ (A) y 100 mg L⁻¹ (B) del inhibidor DMPP durante 7 días.

Macadam et al. (2003) observaron síntomas visuales de toxicidad en presencia del inhibidor DCD (con dosis 2 veces la recomendada) en plantas de trébol. Zerulla et al. (2001) describió síntomas de daño fitotóxico de DCD en lechuga a dosis 8 veces la recomendada. Maftoun et al. (1982) describieron el efecto fitotóxico del inhibidor nitrapirina con distintas fuentes de N en plantas de girasol a dosis de 20 mg L⁻¹ y encontraron que la adición de la nitrapirina no solo redujo el crecimiento de las plantas si no que fue observado un efecto de toxicidad de este inhibidor que se manifestó con una deformación en el margen de las hojas y un crecimiento del tallo tipo zarcillo.

Wissmeier et al. (2001) observaron que después de la aplicación de 2,6 veces la dosis recomendada de DMPP, las hojas de lechuga presentaron quemaduras en los bordes. Sin embargo, Martínez et al. (2015) en plantas de fresa y distintas fuentes de nitrógeno asociadas al inhibidor del DMPP y a dosis recomendada, no observaron daños fitotóxicos por el contrario, se detectó un efecto beneficioso en los tratamientos con DMPP y se observó una coloración verde más intenso en las hojas como resultado del aumento del contenido de clorofila. Esto pone de manifiesto la escasa fitotoxicidad de los inhibidores basado en dimetilpirazol incluso cuando están en contacto permanente la raíz con el inhibidor en disolución.

El resultado obtenido para el inhibidor DMPSA, fue que en el crecimiento tanto de parte aérea como de raíz de Lotus no presentó diferencias significativas en ninguna de las dosis estudiadas con respecto al tratamiento control. Estos resultados concuerdan con los resultados publicados anteriormente por nuestro grupo, en lo cual este inhibidor no afectó al crecimiento de las plantas de trébol en presencia de ninguna de las dosis utilizadas (Rodrigues et al., 2018). Existen pocos estudios realizados con el nuevo inhibidor DMPSA, los cuales determinan su efectividad en suelo, pero no hablan de toxicidad en plantas. Huérfano et al. (2016) concluyeron que este nuevo inhibidor tiene resultados similares al DMPP sobre la producción de trigo y la proteína en grano, y Torralbo et al. (2017), en su estudio con microcosmo observó que el DMPSA fue igualmente eficaz que el DMPP evitando emisiones gaseosas.

En la tabla 2 se muestran los resultados del contenido de los inhibidores en la parte aérea y raíz de plantas de Lotus. El inhibidor DMPP se detectó en todas

las dosis utilizadas tanto en parte aérea como en raíz, pudiéndose observar que el compuesto DMP, DMPP en su forma solubilizada, es absorbido y translocado a la parte aérea. Por otra parte, se pudo observar la absorción y translocación de DMPSA únicamente en las dosis de 10 y 100 mg L⁻¹. El análisis de contenido de DMPSA en tejidos vegetales muestra que dentro de la planta los dos isómeros, 2,3-DMPSA y 3,4-DMPSA, mantienen la proporción similar al 20:80 de la formulación original aportada en la solución nutritiva, 24:76 para la dosis de 10 mg L⁻¹ y 26:74 para la dosis de 100 mg L⁻¹. Estos resultados concuerdan con nuestro estudio con plantas de trébol donde el contenido de los inhibidores también mantiene la misma proporción para ambos isómeros y dosis (Rodrigues et al., 2018).

La tasa de translocación observada del DMPP fue significativamente diferente según la dosis, ya que, para la dosis de 100 mg L⁻¹, del total de producto absorbido, un 87% se translocó hacia la parte aérea, frente a un 23 % para la dosis de 10 mg L⁻¹. La translocación fue significativamente inferior para el inhibidor DMPSA que presentó un 7% y 8% (considerando la suma de las dos isoformas) respectivamente a la dosis de 10 mg L⁻¹ y 100 mg L⁻¹.

Los mecanismos de absorción y de translocación de inhibidores de nitrificación dentro de las plantas siguen siendo desconocidos, así Marsden et al., 2015 describen que para la DCD no hay transportadores de membranas específicos, sin embargo, es posible que la absorción pueda ser facilitada por transportadores de proteínas para moléculas con estructuras similares.

En el ensayo realizado por Artola et al., 2011 con plantas de trigo crecidas en suelo y perlita con una solución nutritiva con una fuente de nitrógeno en forma de urea (dosis de 180 kg N ha⁻¹) y diferentes concentraciones de NBPT [0, 0,012, 0,062 y 0,125% (p/p)], observaron que el NBPT, inhibidor de la ureasa, es absorbido por la planta particularmente en dosis altas, modificando su metabolismo, aunque sea de forma transitoria.

Tanto en nuestro estudio con plantas de trébol (Rodrigues et al., 2018) como en este estudio con plantas de Lotus las proporciones de absorción y translocación de inhibidores se mantuvieron constantes, aunque se observó que la cantidad de los inhibidores absorbidos fue mayor para las plantas de trébol. Este resultado

puede estar relacionado con una mayor área foliar y el doble de biomasa del trébol respecto al Lotus produciéndose una absorción más eficaz en esta especie.

Tabla 2. Contenido del inhibidor de la nitrificación DMPP y DMPSA (2,3 y 3,4 DMPSA) en tejidos de plantas de Lotus. El contenido de inhibidor se expresa como μmol por gramo de peso seco. Las letras diferentes significan diferencias significativas entre las dosis de inhibidor para un compuesto determinado y tejido ($P < 0.05$). "N.d." significa que no se ha detectado. Cada valor representa la media \pm error estándar ($n = 4$).

Tratamiento	Compuesto	Órgano	Dosis del IN (mg L^{-1})			
			0	1	10	100
DMPP	DMP	Parte aérea	n.d.	$0,031 \pm 0 \text{ c}$	$0,25 \pm 0,01 \text{ b}$	$7,6 \pm 1,78 \text{ a}$
		Raíz	n.d.	$0,062 \pm 0 \text{ c}$	$0,52 \pm 0,02 \text{ b}$	$5,04 \pm 0,53 \text{ a}$
DMPSA	2,3 DMPSA	Parte aérea	n.d.	n.d.	$0,019 \pm 0,004 \text{ b}$	$0,37 \pm 0,01 \text{ a}$
		Raíz	n.d.	n.d.	$0,14 \pm 0,018 \text{ b}$	$3,75 \pm 0,22 \text{ a}$
	3,4 DMPSA	Parte aérea	n.d.	n.d.	$0,06 \pm 0,042 \text{ b}$	$0,25 \pm 0,06 \text{ a}$
		Raíz	n.d.	n.d.	$0,4 \pm 0,136 \text{ b}$	$10,35 \pm 0,59 \text{ a}$

Hasta la fecha pocos estudios fisiológicos se ha realizado con productos tipo inhibidor de la nitrificación sobre su efecto en las plantas; la mayoría de los estudios se han hecho sobre su efectividad sobre las bacterias, suelos, emisiones de gases, etc (Menéndez et al., 2006; Huérfano et al., 2016, Torralbo et al., 2017). Cruchaga et al. (2011) y Artola et al. (2011) realizaron estudios del efecto sobre plantas de un inhibidor de la ureasa, como es el NBPT. La diferencia de estos estudios con los nuestros es que la enzima diana, ureasa, es conocida y está bien descrita tanto en bacterias, suelos y plantas. En estos estudios se vio que estaba afectada esta enzima y que produce modificaciones en el metabolismo del nitrógeno en plantas. Sin embargo, en nuestro estudio la enzima diana no es del todo conocida, aunque creemos que la enzima diana de nuestros inhibidores es la AMO, esta enzima existe únicamente en bacterias, pero no en plantas. Así que el posible efecto que estos inhibidores causan en el metabolismo de las plantas cuando entra es totalmente desconocido, lo que sí

vemos es que existe un efecto fenotípico con ciertas muestras de toxicidad en presencia de altas dosis, pero todavía no sabemos a qué punto está afectando.

Para resolver este tema, en este ensayo utilizamos las herramientas de estudios moleculares, como son la transcriptómica y la proteómica para intentar ver en qué punto la acumulación de DMP puede estar afectando al metabolismo de las plantas de Lotus. Se seleccionaron plantas del tratamiento control y plantas de tratamiento de 10 mg L⁻¹ de DMPP para el estudio. La dosis de 10 mg L⁻¹ de DMPP nos garantiza que el inhibidor ha sido absorbido y translocado a la parte aérea, que es donde hacemos estas analíticas, pero por otro lado es una dosis que no causa un daño muy patente a la planta de forma que podemos determinar más fácilmente la parte del metabolismo y fisiología potencialmente afectadas.

Tras los resultados obtenidos del análisis transcriptómico y proteómico, vimos que la afectación no era muy patente ni se centraba en una ruta concreta. Por lo tanto, decidimos realizar una comparativa de los genes modulados por el inhibidor DMPP en plantas de Lotus con los genes modulados por estreses tipo sequía (Díaz et al., 2010), salinidad (Sánchez et al., 2008) y frío (Calzadilla et al., 2016).

Para el análisis transcriptómico se utilizó un *microarray* específico de *Lotus japonicus* e hibridado con el RNA total de la parte aérea. Los cambios en la expresión génica fueron analizados en la parte aérea entre control y en las tratadas con 10 mg L⁻¹ y se analizaron por comparación basada en la significación a la tasa de descubrimiento falso (FDR) de < 0,05. La tabla 3 muestra el número total de genes diferencialmente expresados por el tratamiento del IN DMPP y los números de genes comunes modificados por el DMPP y los otros estreses anteriormente citados.

En los resultados obtenidos del análisis transcriptómico se encontró un total de 227 genes expresados diferencialmente, de los cuales 163 genes fueron inducidos (up) y 64 genes fueron reprimidos (down) en presencia del inhibidor, de los cuales 84 genes estuvieron modulados para algún estrés. Se realizó una comparativa de la lista de genes con *microarrays* disponibles de Lotus y bases de datos de Lotus (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>) con estreses como pueden ser la sequía, salinidad y frío. De los 227 genes totales, 56 están modificados por

sequía y en 12 casos tienen el mismo sentido que nuestra transcriptómica, siendo 11 genes inducidos y 1 reprimido. Los genes modificados por salinidad son 38 en total, siendo 17 genes en el mismo sentido, de los cuales 12 genes inducidos y 5 reprimidos. Sin embargo, fueron pocos los genes modificados por frío, un total de 7 genes, de los cuales 5 fueron inducidos y ninguno reprimido por el DMPP. La lista completa de los 227 genes modulados significativamente por presencia del inhibidor DMPP se puede encontrar en línea como material complementario (Tabla Suplementaria S1).

Se generó una visión general de los diferentes genes modulados en respuesta a estrés generado por el tratamiento con el inhibidor DMPP utilizando el programa MapMan (Imagen 2). Entre los genes inducidos se encontraron genes implicados en la proteólisis, respuesta hormonal y estado redox. Los veinte genes implicados en la proteólisis codifican para una ubiquitina ligasa E3, de los cuales 19 de ellos son inducidos. Las ubiquitinas ligasa E3 están involucradas en una modificación postraducciona específica de los eucariotas y ha sido reconocida como un importante medio de regulación de las proteínas, sea marcando la degradación de la proteína o en algunos casos modulando la actividad o localización de las proteínas (Komander, 2009). Las hormonas actúan como señales que pueden regular, estimular o inhibir el desarrollo de las plantas, y pueden estar implicadas como compuestos de señalización en respuesta a tensiones bióticas y abióticas; quince genes inducidos están relacionados con la respuesta hormonal, de ellos trece están relacionados con etileno (*Lj1g3v2326740.1*, *Lj6g3v1007880.2*, *Lj1g3v2766570.1*, *Lj4g3v1335210.1*, *Lj1g3v3542680.1*, *Lj5g3v1015320.1*, *Lj2g3v2088190.1*, *Lj2g3v2016240.1*, *Lj3g3v0548550.1*, *Lj3g3v0509780.1*, *Lj0g3v0317699.1*, *Lj4g3v0586770.1*, *Lj5g3v1167370.1*) y tres genes con auxinas (*Lj3g3v0290450.1*, *Lj0g3v0009669.1*, *Lj0g3v0075119.1*), sin embargo, un gen que codifica la síntesis de jasmonato (*Lj0g3v0075119.1*) está reprimido. Siete genes modifican en el estado redox, de los cuales cuatro están inducidos (*Lj6g3v0485170.1*, *Lj2g3v2136010.1*, *Lj3g3v2825320.1*, *Lj0g3v0123979.1*) y cuatro reprimidos, entre ellos dos glutatión transferasas (*Lj6g3v0339500.1* y *Lj5g3v1697000.1*). Esto puede sugerir una amplia relación del estrés oxidativo, que puede ocurrir bajo diferentes estreses ambientales, y bajo daño fisiológico. Esta actividad

celular, el estrés oxidativo conduce a una inducción o represión de genes que codifican proteínas estructurales, enzimas de defensa celular y factores de transcripción (Dalton et al., 1999). Entre otros también podemos destacar un transportador de nitrato (NRT1.5) y un nitrito reductasa reprimido, y tres genes de respuesta a la senescencia inducidos (*Lj5g3v0433520.1*, *Lj1g3v1788290.1*, *Lj0g3v0038179.1*). Meng et al. (2016) en su estudio con plantas *Arabidopsis thaliana* silvestres y mutantes *nrt1.5* encontraron que el gen NRT1.5, independiente de su función como transportador de nitrato, es esencial para la percepción de señales, con lo cual protege la planta para entrar en senescencia en condiciones en la que exista falta de nitrato, ya que además de su función nutricional, la ausencia de nitrato podría tener un papel de señalización en la senescencia temprana de las hojas.

La categoría de genes que más se modula en presencia de DMPP es la de los factores de transcripción (TFs), de los cuarenta y tres de los genes modulados la mayoría pertenecen a las familias MYB, WRKY, bHLH, NAC y AP2/EREBP. Los factores de transcripción MYB homólogos con *Arabidopsis*, MYB62 y AtMYB12 se relacionan con respuestas al agotamiento de P y reguladores de la biosíntesis de flavonoides; los NAC, son TFs que participan en la resistencia al estrés biótico, la respuesta a la desecación y el control de la senescencia; los TFs WRKY presentan función en respuesta a estreses bióticos y abióticos. Nueve de los cuarenta y tres son TFs AP2/EREBP, factores de respuesta a etileno, considerada una superfamilia de los TFs son reguladores de una amplia variedad de genes diana relacionados con la respuesta al estrés y el desarrollo a través de diferentes mecanismos, también muestran algunos defectos de desarrollo como la senescencia y un crecimiento reducido en condiciones normales o sensibilidad a la condición de estrés (Phukan et al., 2017). La alteración de la expresión de factores de transcripción en las plantas a través de la ingeniería genética puede afectar varias vías de señalización y mejorar la tolerancia al estrés abiótico Wang et al. (2016).

Tabla 3. Genes modificados en plantas de Lotus crecidas durante siete días en presencia del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹). (*) Total: genes comunes modificados del estrés de DMPP y en otros estreses. Up y Down: genes modificados en el mismo sentido del estrés de DMPP y en otros estreses.

	Transcriptómica Lotus		
	Total	Up	Down
Genes	227	163	64
*Sequía	56	11	1
Salinidad	38	12	5
Frío	7	5	0

Tabla 4. Proteínas que presentan variaciones en el análisis proteómico en plantas de Lotus crecidas durante siete días en presencia del inhibidor de la nitrificación DMPP. (*) Total: genes comunes modificados del estrés de DMPP y en otros estreses. Up y Down: genes modificados en el mismo sentido del estrés de DMPP y en otros estreses.

	Proteómica Lotus		
	Total	Up	Down
Proteínas	59	19	40
*Sequía	19	3	14
Salinidad	3	1	0
Frío	-	-	-

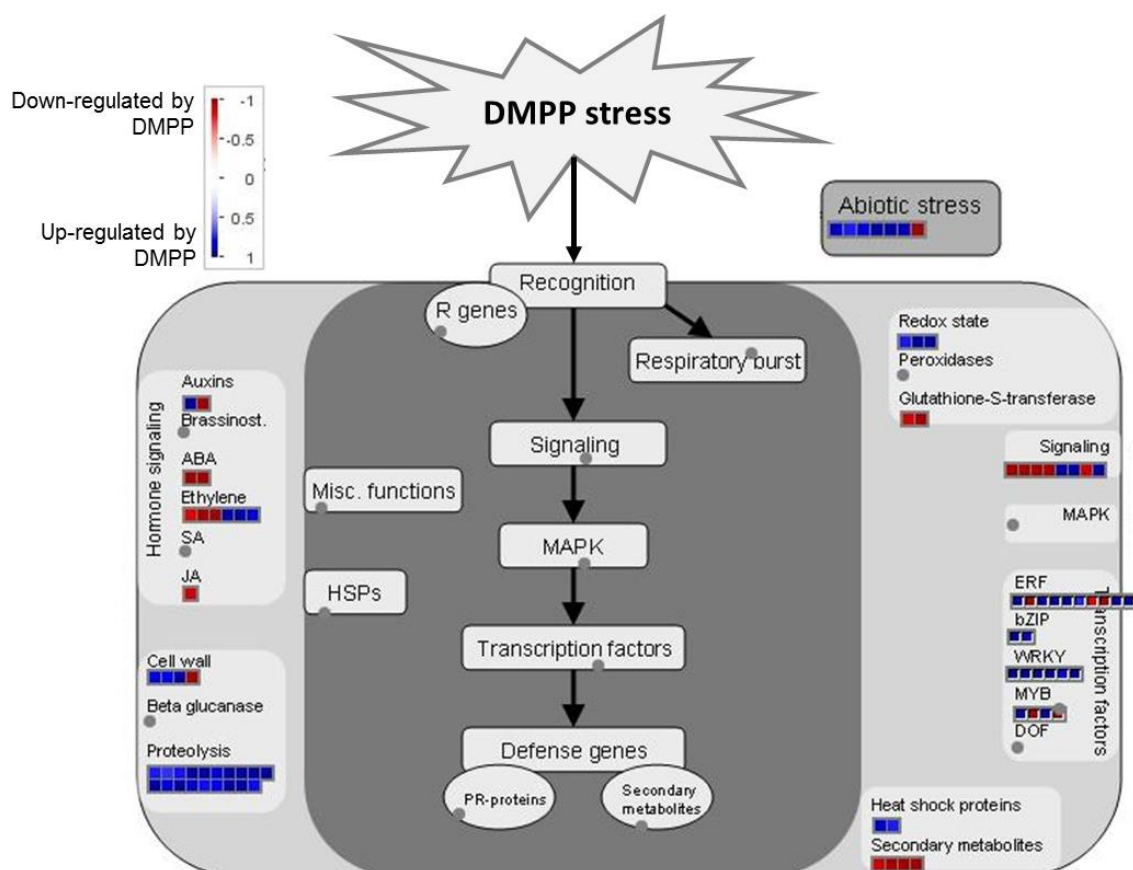


Imagen 2- Genes modulados en la parte aérea de plantas de Lotus en respuesta al DMPP en el contexto de la respuesta general a estrés. Cada cuadrado corresponde a un gen. Rojo y azul indica una expresión más baja y más alta que el control, respectivamente. El esquema se regeneró con el software MapMan 3.6.

En el análisis proteómico identificamos un total de 1730 proteínas, de las cuales, aproximadamente el 66% (1149 proteínas) fueron identificadas por al menos un péptido único (o sea, exclusivo de la proteína). De las proteínas cuantificadas 59 de ellas mostraron un contenido distinto ($p < 0,05$), siendo 19 proteínas más abundantes y 40 menos abundantes en presencia del inhibidor DMPP. Para la realización de un análisis del enriquecimiento funcional de las proteínas identificadas, se utilizó la base de datos Gene Ontology.

Para que fuera posible un enlace entre proteómica y transcriptómica se realizó una búsqueda de las proteínas y su correspondiente gen tanto en el genoma de Lotus como de *Genebank*, así siendo posible realizar una comparación entre las proteínas y genes modificados en plantas de Lotus por diferentes estreses

(sequía, salinidad y frío). En la tabla 4 podemos ver que 19 de los genes que codifican para las proteínas cuyo contenido se vio alterado por DMPP, se modulan en condiciones de sequía y en 17 de los casos en el mismo sentido de la proteómica, siendo 3 más expresados y 14 menos expresados. Tres genes se expresan por salinidad, aunque solamente un gen se modifica, expresado, en el mismo sentido de la proteómica.

Entre las proteínas cuyo contenido se vio alterado por DMPP, los grupos más representados corresponden aproximadamente: un 12% al metabolismo energético y del carbono, un 10% a la síntesis de proteínas y un 10% a la fotosíntesis y síntesis de clorofila.

El análisis de los datos ómicos obtenidos muestra que hay una cierta coherencia entre los resultados del análisis proteómico con la transcriptómica donde los genes más inducidos parecen estar relacionados con la respuesta a estrés. Aunque muchos autores demostraron que es habitual encontrar incoherencias entre los análisis transcriptómicos y proteómicos debidas a las diferentes formas de análisis de datos, a los diferentes modelos bioinformáticos utilizados, a posibles proteólisis de proteínas una vez sintetizadas, a la regulación postranscripcional y/o al retraso entre la transcripción y la síntesis proteica incluso si se está analizando el mismo conjunto de datos (Liu et al., 2016).

Los resultados obtenidos tienen relación con una hipótesis de que una posible senescencia esté produciéndose con el DMPP, la senescencia puede inducir una proteólisis, como lo que sugiere los análisis de la transcriptómica y que al liberarse amonio se estimule la síntesis de GS1 como se observa en los análisis de la proteómica. En este sentido en proteómica, seis de las cuarenta proteínas con menor abundancia son proteínas ribosomales. En relación con la posible senescencia inducida, en proteómica hay unas cuantas proteínas, casi todas con menor abundancia, relativas a la fotosíntesis y síntesis de clorofila junto con algunas del metabolismo energético y de carbono (Tabla Suplementaria S2).

Por otra parte, los datos obtenidos reflejan alteraciones en el estado redox de la planta. Por una parte, en la transcriptómica aparece un gen de oxidasa alternativa reprimido y en proteómica una proteína alternativa oxidasa con mayor abundancia perteneciente a un *locus* distinto, además en la proteómica también hay varias proteínas implicadas en procesos redox, como la glutatión peroxidasa

(Q56VS3) que está más abundante y la proteína que codifica una tioredoxina (I3S916) que está menos abundante, ambas enzimas están implicadas como antioxidantes celulares.

En transcriptómica la categoría relativa al etileno aparecía como importante y en proteómica identificamos la proteína que codifica una ACC-oxidasa (I3T2N4), enzima de síntesis del etileno que se expresa en menor abundancia en los tratamientos con el inhibidor DMPP.

A pesar de que las plantas fueron sometidas a una concentración de 10 mg DMPP L⁻¹, en principio una concentración relativamente alta para suelo, pero que en los ensayos previos está no produjo síntomas de toxicidad en las plantas, podemos decir que la modulación de los genes tampoco es muy amplia si comparamos con los muchos estudios que existen descritos sobre efectos de algunos estreses. Los resultados obtenidos reflejan la respuesta de las plantas al DMPP, lo cual tiene características comunes a diferentes tipos de estreses, y presenta modulaciones de genes y expresiones de proteínas que pueden indicar el inicio de una senescencia temprana, y que posiblemente esté afectando el estrés oxidativo. Aunque los datos de transcriptómica de momento no están validados por q-PCR nos planteamos la forma de validar estos resultados con medidas fisiológicas relacionadas con el metabolismo hormonal, metabolismo redox, pigmentos fotosintéticos y metabolismo del carbono y nitrógeno.

Por otra parte, viendo que los resultados de la transcriptómica indican el inicio de una senescencia temprana, dejamos plantas de Lotus tratadas con el inhibidor de la nitrificación DMPP durante 15 días con el tratamiento con 0 y 100 mg del inhibidor L⁻¹ y observamos que su crecimiento se vio afectado significativamente por el inhibidor con un descenso en la producción de biomasa de un 30% y 50% en parte aérea y raíz respectivamente (Figura 1). Visualmente observamos una defoliación en las plantas expuestas a la concentración de 100 mg DMPP L⁻¹ durante 15 días, pudiendo reflejar una entrada de las plantas en la fase de senescencia (Imagen 3).

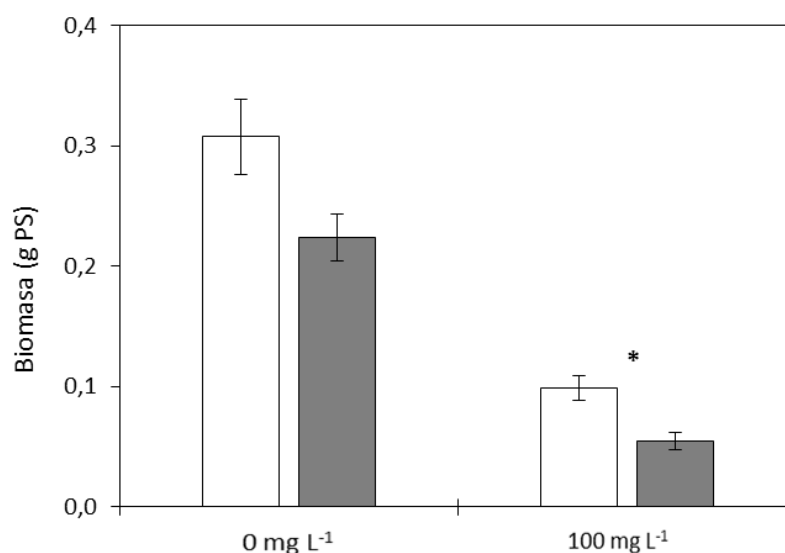


Figura 1. Biomasa de plantas de Lotus (parte aérea y raíces) expuesta durante 15 días a 0 mg L⁻¹ y 100 mg DMPP L⁻¹. Cada valor representa la media \pm error estándar (n = 10) expresada como g de peso seco por planta. El asterisco representa diferencias significativas (Student t-test $p \leq 0.05$) entre ausencia del inhibidor (0 mg L⁻¹) y dosis de 100 mg DMPP L⁻¹ ($P < 0.05$).



Imagen 3- Plantas de Lotus crecidas en cultivo hidropónico bajo condiciones controladas, control (0 mg L⁻¹) y con dosis de 100 mg DMPP L⁻¹ durante 15 días.

2.4.3. Posibles aspectos fisiológicos afectados por el inhibidor de la nitrificación DMPP en plantas de Lotus

2.4.3.1 Metabolismo redox

En las plantas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, están siendo generadas de forma continua en sus células. Estas ROS se generan a partir de la reducción incompleta del oxígeno en diferentes procesos fisiológicos que implican reacciones redox como las cadenas de transporte electrónico. Estas moléculas tienen como característica común la capacidad de producir daño oxidativo a lípidos, proteínas y DNA; no obstante, la producción y eliminación de estas ROS se encuentran muy controladas. Estas propiedades citotóxicas explican la evolución de una serie de mecanismos de desintoxicación, enzimáticos y no enzimáticos en las plantas. Las ROS como el radical superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\cdot OH$) son generadas durante el metabolismo celular y su producción es acentuada cuando las células son sometidas a estrés, alterándose ese controlado equilibrio, desencadenando un estrés oxidativo y produciendo daños oxidativos en las biomoléculas vegetales (Moran et al., 1994). Su producción tiene lugar en los cloroplastos, mitocondrias, membrana plasmática, apoplasto, retículo endoplasmático y pared celular. Los niveles de las ROS son también incrementados debido a cambios extremos en el medio como el aumento de la concentración de sales, el estrés hídrico, fluctuaciones extremas de temperatura (Arora, et al., 2002), así como por el estrés biótico causado por la interacción planta-patógeno (Apel y Hirt, 2004). Los mecanismos redox no solo regulan la transcripción génica en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Herouart et al., 1993, Levine et al., 1994; Allen, 1995a), sino que también han sido implicados en la activación de factores de transcripción de plantas (Babiychuk et al., 1994).

Los resultados obtenidos con los análisis transcriptómico y proteómicos del efecto del DMPP, reflejan una respuesta de las plantas que presenta características comunes a diferentes tipos de estreses, y muestra modulaciones de genes y expresión de proteínas que pueden indicar el inicio de una senescencia temprana y posiblemente un estrés oxidativo. Por ello realizamos el

estudio de varios procesos fisiológicos relacionados con el metabolismo redox, metabolismo hormonal entre otros.

Aunque tanto la transcriptómica como la proteómica se han realizado sobre la parte aérea, la medida de la respiración se realizó en las raíces de la planta, ya que la técnica disponible de medida era en fase líquida y se eliminaba la interferencia de los procesos de fotosíntesis y fotorrespiración presentes en las hojas. Hay que tener en cuenta, que la planta es capaz de enviar, desde la raíz, señales a la parte aérea para efectuar cambios fisiológicos (Kramer y Boyer, 1995).

La respiración desempeña un papel muy importante en las respuestas adaptativas de las plantas a diferentes estreses abióticos, a través de la síntesis de ATP, el suministro de esqueletos carbonados y la regulación del estado redox celular, funciones fisiológicas que están involucradas en el proceso respiratorio; sin embargo, la respiración es considerada un proceso altamente sensible a los cambios ambientales (Atkin y Macherel, 2009; Foyer & Noctor 2011; Araújo et al., 2012).

La actividad respiratoria se determinó midiendo el consumo de oxígeno por un oxígrafo, añadiendo los diferentes inhibidores: ácido salicilhidroxámico (SHAM) para inhibir la ruta de la oxidasa alternativa y el KCN para inhibir la ruta citocrómica (Tabla 5). Según, González-Meler et al. (1998) esta técnica puede ser útil para comparar cualitativamente los efectos de diferentes tratamientos en las dos vías de transporte de electrones. Los resultados obtenidos indican que la respiración total de las raíces de plantas de Lotus no se vio significativamente afectada por la presencia del DMPP a una concentración de 10 mg L⁻¹. La respiración residual (Rr), determinada después de inhibir las vías alternativas (AOX) y citocrómica, fue similar en las raíces tanto para las procedentes de plantas control como para las tratadas con DMPP, representando un 12% y 17% respectivamente de la respiración total. Aunque no se observen diferencias significativas entre las capacidades de las diferentes vías respiratorias, podemos decir que sí parece apreciarse una tendencia a la disminución de la actividad de la vía citocrómica en presencia del DMPP. Tampoco podemos apreciar diferencias significativas entre el control y el tratamiento, en la ratio respiración alternativa/citocrómica que pudiera indicar que esté favorecida una u otra vía

respiratoria. Hasta el momento no hemos encontrado en la bibliografía ningún estudio del efecto de los inhibidores de la nitrificación sobre la respiración de las plantas. Sin embargo, existen estudios de la influencia de compuestos de carácter herbicida y de distintos estreses sobre la respiración así, Armendáriz et al. (2015) observaron en su estudio con plantas de guisante tratadas con imazamox y glifosato que la respiración total no se vio afectada, sin embargo, Hong y Feng (2005) observaron que la respiración total disminuía su actividad en plantas de trigo bajo condiciones de estrés hídrico.

Tabla 5. Respiración total, residual, así como las capacidades de la vía citocrómica y alternativa ($\text{nmol O}_2 \text{ g peso fresco}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de raíces de plantas de Lotus en condiciones control (0 mg L^{-1}) y tratadas con 10 mg L^{-1} de DMPP. Los valores son la media \pm error estándar ($n = 4$).

DMPP	Respiración ($\text{nmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ PF min}^{-1}$)				Ratio Alternativa/ Citocrómica
	Total	Residual	Citocrómica	Alternativa	
0 mg L^{-1}	$430 \pm 27 \text{ a}$	$52 \pm 1 \text{ a}$	$221 \pm 24 \text{ a}$	$118 \pm 5 \text{ a}$	$0.55 \pm 0.06 \text{ a}$
10 mg L^{-1}	$442 \pm 20 \text{ a}$	$74 \pm 17 \text{ a}$	$182 \pm 16 \text{ a}$	$119 \pm 16 \text{ a}$	$0.65 \pm 0.07 \text{ a}$

El ascorbato (AsA), glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH) en el caso de leguminosas, son metabolitos de bajo peso molecular con actividad antioxidante que desempeñan funciones clave en el crecimiento, el desarrollo y las respuestas al estrés (Norton y Foyer, 1998; Pastori et al., 2003). El AsA es el compuesto reductor hidrosoluble más importante en medios acuosos, presente en todas las plantas vasculares a elevadas concentraciones del orden mM (Dalton, 1995) y sus propiedades como antioxidante hacen que pueda reaccionar con las diferentes especies reactivas de oxígeno. El GSH está relacionado con la fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés y presenta un papel clave en el control del estado redox celular, debido a su potencial redox que le permite reducir eficazmente el deshidroascorbato (Moran et al., 2000), así como reaccionar directamente con los radicales OH^* y $\text{O}_2^{\cdot-}$ con una intensidad elevada (Halliwell y Gutteridge, 2000).

Con el fin de evaluar el efecto del DMPP sobre el metabolismo oxidativo en plantas de Lotus, se cuantificaron los contenidos de ascorbato (AsA), dehidroascorbato (DHA), glutatión (GSH) y homoglutatión (hGSH) en sus formas oxidadas y reducidas, en parte aérea y raíz (Tabla 6). Como podemos observar, hubo importantes diferencias en el contenido de estos metabolitos entre la raíz y la parte aérea, ya que mientras en la parte aérea se pudieron cuantificar todos los metabolitos excepto la forma reducida del GSH (GSSG), en raíces con la metodología empleada, solo se pudo determinar las formas reducidas y oxidadas del homoglutatión. Los resultados mostraron que solo la forma oxidada del homoglutatión (hGSSG) se incrementó de forma significativa en la parte aérea de plantas de Lotus tratadas con DMPP, sin embargo, de los resultados tanto de transcriptómica como de proteómica no se pueden extraer ninguna conclusión ya que las enzimas responsables de su biosíntesis, la γ -glutamyl cisteína sintetasa y la homoglutatión sintetasa no se encuentran afectadas por el tratamiento con DMPP. El resto de los metabolitos no presentaron diferencias significativas entre plantas control y tratadas con DMPP.

Tabla 6. Niveles de antioxidantes (AsA, DHA, GSH, GSSG, hGSH y hGSSG) en parte aérea y raíz de plantas de Lotus control y crecidas en presencia del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹). Los datos representan el promedio \pm error estándar (n = 4), expresados en μ mol g⁻¹ peso seco. "n.d." significa no detectado.

	Parte aérea		Raíz	
	0 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	0 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
AsA	4.32 \pm 0.73	4.34 \pm 0.74	n.d.	n.d.
DHA	4.71 \pm 1.35	6.97 \pm 0.49	n.d.	n.d.
GSH	1.92 \pm 0.05	1.95 \pm 0.20	n.d.	n.d.
GSSG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
hGSH	2.76 \pm 0.28	2.20 \pm 0.13	7.84 \pm 2.77	7.24 \pm 0.99
hGSSG	2.08 \pm 0.23	3.31 \pm 0.15 *	7.56 \pm 1.59	6.20 \pm 0.62

El papel del hGSH y su forma oxidada, hGSSG, aunque no está demostrado de forma concluyente, se sugiere que podrían actuar como moléculas señal en condiciones de estrés abiótico (Foyer et al, 1997). Este metabolito está presente

en los nódulos y otros órganos de algunas especies de leguminosas conjuntamente con el GSH o en el lugar del GSH (Matamoros et al., 1999) y puede compartir con él alguna de sus propiedades reguladoras, sugiriendo que en condiciones de estrés oxidativo permitiría un aumento de la síntesis de GSH (Smith et al., 1984). En las hojas de caupí, el glutatión es el tripéptido dominante y el homoglutaratión está casi completamente ausente (Matamoros et al., 1999) mientras que, en soja, tanto el homoglutaratión como el glutatión están presentes (Klapheck, 1988; Matamoros et al., 1999).

En raíces, por el contrario, no se encontró ninguna diferencia significativa en el contenido de homoglutaratión, única molécula cuantificada, entre el control y las plantas tratadas con DMPP.

El estrés oxidativo sucede bajo diferentes tipos de estreses ambientales y está relacionado con el daño fisiológico. La producción y eliminación de ROS debe estar muy controlada y su equilibrio puede verse afectado en diversas situaciones de estrés, como la salinidad, sequía, toxicidad por metales, ataque de patógenos y alta luminosidad entre otros estreses (Sharma et al., 2012).

El daño oxidativo a lípidos se debe a la producción excesiva de ROS y este afecta el funcionamiento celular. La peroxidación de lípidos se produce como consecuencia del estrés oxidativo debido a la producción de aldehídos reactivos que, a su vez, dañan las proteínas y el DNA. El producto de la peroxidación lipídica es utilizado como un indicador de daño en las células vegetales (Sharma y Dubey, 2005; Mishra et al., 2011). Los productos de la peroxidación lipídica pueden ser aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (MDA), que es utilizado como marcador de daño oxidativo en tejidos animales y vegetales.

El daño oxidativo a proteínas es debido a la modificación oxidativa dada por la conjugación con productos de degradación de la peroxidación de lípidos como consecuencia del ataque de radicales libres que altera el funcionamiento de la célula (Levine et al., 1990; Yamauchi et al., 2008). Para determinar si el DMPP es capaz de producir estrés oxidativo, se estimaron los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y de proteínas carboniladas en plantas de Lotus.

Es de destacar que nuestros resultados muestran una disminución significativa en la peroxidación lipídica en las raíces de plantas tratadas con DMPP (Figura 2), este resultado es sorprendente en el sentido de que esperaríamos una mayor peroxidación lipídica en las plantas que en principio manifiestan una situación de estrés. Cakmak y Horst (1991) cuestionaron el uso del ensayo con TBA para evaluar la peroxidación lipídica en los tejidos radiculares, aunque las modificaciones realizadas en el estudio de Hodges et al. (1999) e incluidas en este ensayo ha hecho posible que los datos puedan ser considerados fiables. La disminución de la peroxidación lipídica detectada en la raíz de las plantas de Lotus con DMPP es difícil de interpretar sin embargo, Zabalza et al. (2007) en un experimento con plantas de guisante tratadas con el herbicida imazamox, observaron igualmente una reducción significativa en el contenido de MDA en las raíces de guisante; estos autores sugieren que la disminución en el contenido de MDA detectado en las raíces de plantas tratadas con el herbicida podría deberse a cambios en la composición de ácidos grasos (con un nivel más bajo de ácidos grasos poliinsaturados). Calzadilla et al. (2016) evaluaron la respuesta al frío de las plantas de Lotus, observando que los niveles de peroxidación de lípidos no presentaron diferencias significativas, sin embargo, otros autores describieron un aumento de la peroxidación lipídica cuando las plantas fueron sometidas a un estrés hídrico (Díaz et al., 2010; Betti et al., 2012)

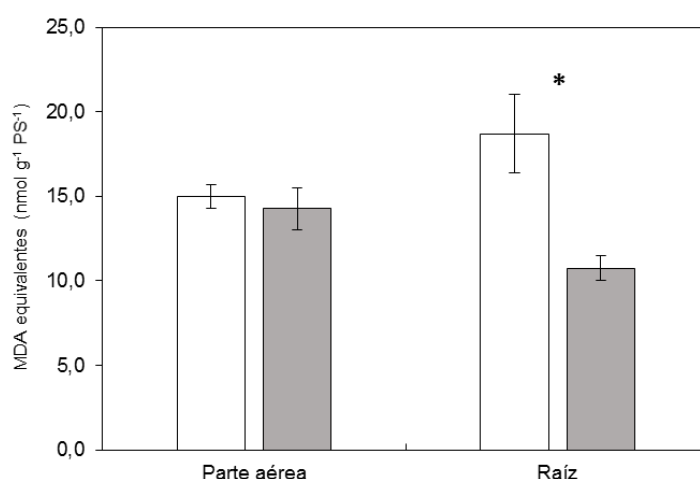


Figura 2. Contenido de MDA en parte aérea y raíz de Lotus, en plantas control (blanco) y en presencia de 10 mg DMPP L⁻¹ (gris). Los valores son el promedio \pm error estándar ($n = 4$). Las diferencias entre control y 10 mg DMPP L⁻¹ se muestran mediante asteriscos cuando significativas; $p < 0,05$, prueba t de Student.

Por el contrario, cuando se determinó la carbonilación de las proteínas, esta no presentó diferencias significativas entre el control y el tratamiento con DMPP, ni en la parte aérea ni en la raíz (Figura 3).

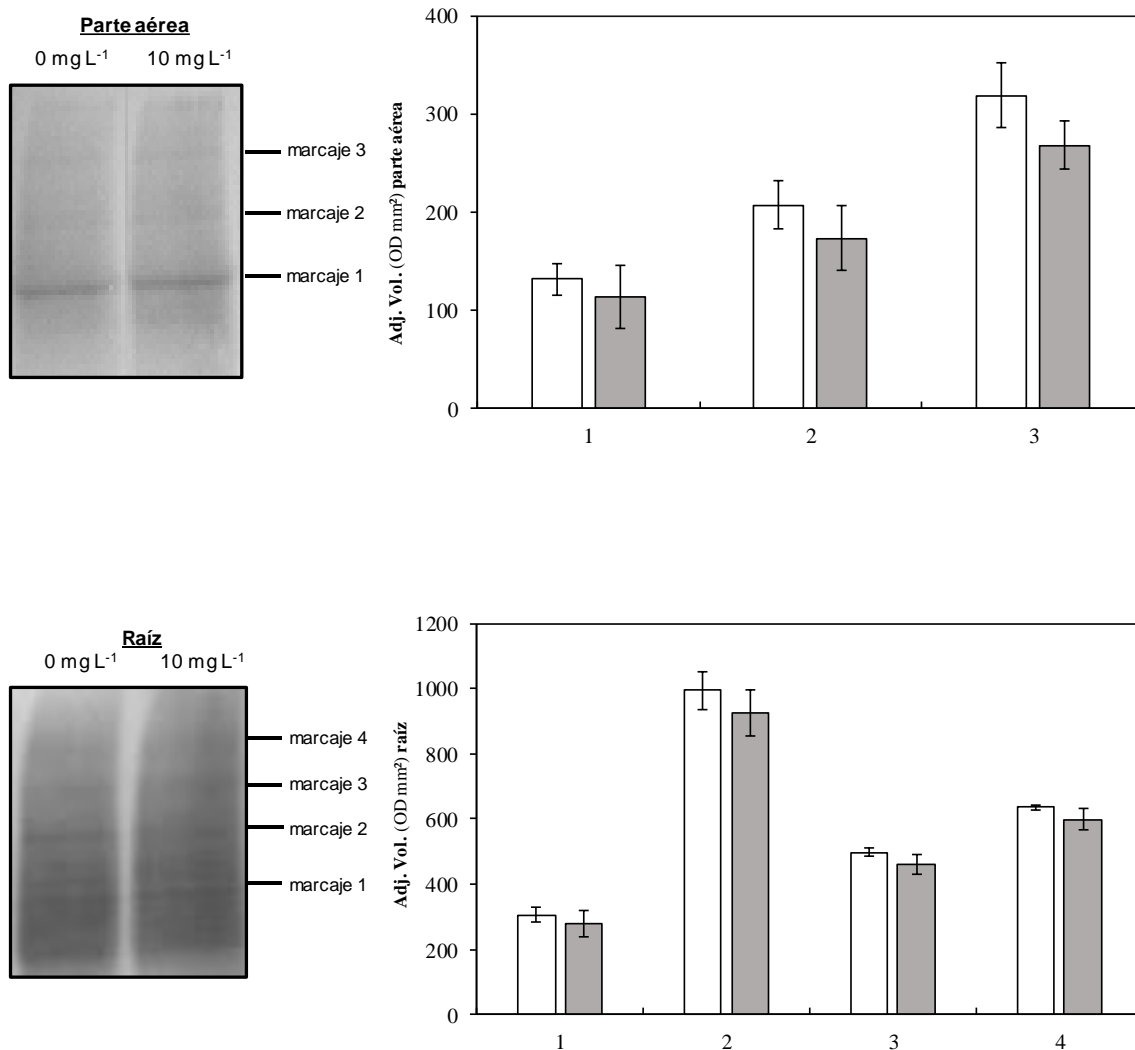


Figura 3. Oxidación de proteínas. A la izquierda, una comparación de los perfiles de marcaje observados en la parte aérea y raíz de Lotus en plantas control y en presencia del inhibidor DMPP (10 mg L⁻¹). Las proteínas marcadas colorimétricamente se detectaron a partir de geles de proteína mediante revelado por colorimetría. Las señales se cuantificaron usando un densitómetro, y los resultados se muestran en el gráfico de barras, 0 mg L⁻¹ (blanco) y 10 mg DMPP L⁻¹ (gris). Los valores representan el promedio \pm error estándar (n = 4).

Podemos concluir a la vista del conjunto de resultados obtenidos, que el DMPP no produce, a la concentración estudiada y en las condiciones de ensayo realizadas, un estrés oxidativo claro en plantas de Lotus.

2.4.3.2 Metabolismo hormonal

En los ambientes naturales, las plantas están sometidas de forma continua tanto a estreses abióticos (sequía, temperatura, salinidad, radiación, metales pesados, etc) como bióticos, causados por diferentes organismos patógenos (bacterias, hongos, virus e insectos), que pueden poner en peligro tanto su supervivencia como la capacidad reproductora de las mismas. Cuando se encuentran bajo condiciones de estrés (abióticos y bióticos), las plantas activan un complejo sistema de respuestas para aliviar el daño celular y mantener su supervivencia (Fuoco et al., 2013). Las hormonas actúan como señales que pueden regular, estimular o inhibir el desarrollo de las plantas (Ashraf et al., 2010; Denancé et al., 2013). Las hormonas vegetales etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico se considera que desempeñan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes de las plantas. Por otro lado, otras hormonas vegetales, como auxinas, ácido abscísico (ABA), citoquininas, giberelinas y brasinoesteroides, que se han venido describiendo fundamentalmente como reguladores del desarrollo y crecimiento de las plantas, en la actualidad también se les está asignando un papel clave como reguladores de la inmunidad de las plantas (Denancé et al., 2013).

Respecto al contenido de hormonas estudiadas en raíces de plantas de Lotus tratadas con 10 mg DMPP L⁻¹ y sin tratar, solamente presentaron diferencias significativas en la concentración de ácido jasmónico. Con el tratamiento de DMPP, esta hormona vegetal presentó una reducción de 71% respecto al control (Tabla 7). Resulta interesante que cambian varios genes relacionados con estrés biótico/abiótico y que cambie también el contenido de ácido jasmónico, ya que este suele variar justo por ataques de patógenos.

Shan y Liang (2010) indicaron que el ácido jasmónico parece estar involucrado en el ciclo ascorbato-glutatión el cual juega un papel clave para la detoxificación del peróxido de hidrógeno y por lo tanto, podría proteger a las plantas del estrés oxidativo; asimismo estos autores indicaron que el ácido jasmónico incrementa

los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa.

También se observó un ligero incremento en el contenido de ácido salicílico, si bien sin presentar diferencias significativas. El resto de las hormonas estudiadas (ácido abscísico, ácido indolacético, giberelinas y citoquininas totales), tampoco presentaron diferencias significativas entre ambos tratamientos. Clarke et al. (2009) y Maksymiec (2007) demostraron que el ácido salicílico está implicado en procesos de señalización en respuesta a estreses tanto bióticos y abióticos. Se ha sugerido que esta hormona tiene un gran potencial para mejorar la tolerancia a los estreses en plantas; sin embargo, su efecto depende fundamentalmente de la concentración aplicada, del modo de aplicación y del estado de desarrollo de las plantas. En general, cuando se aplica a bajas concentraciones, se reducen los efectos de los estreses abióticos mientras que la aplicación de altas concentraciones induce un estrés oxidativo, lo que conduce a una disminución de la tolerancia a los estreses abióticos (Miura y Tada, 2014). Por otra parte, su acumulación endógena es inducida por varios estreses abióticos y bióticos. Sin embargo, todavía no se conoce cómo se puede distinguir la acumulación de ácido salicílico para cada tipo de estrés. Sería de gran interés conocer el mecanismo de cómo las plantas distinguen una inducción de ácido salicílico para cada estrés, este conocimiento contribuiría de forma importante a la clarificación de la especificidad de las respuestas de la planta al estrés abiótico (Miura y Tada, 2014).

Tabla 7. Contenido de hormonas en raíces de plantas de Lotus sin tratar (plantas control) y tratadas con 10 mg DMPP L⁻¹. Los valores representan el promedio \pm error estándar (n = 3), expresados en $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco. El asterisco representa diferencias significativas (Student t-test $p \leq 0.05$) entre ausencia del inhibidor (0 mg L⁻¹) y dosis de 10 mg DMPP L⁻¹.

Contenido de hormonas ($\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco)						
DMPP	Ácido abscísico	Ácido indolacético	Ácido jasmónico	Ácido salicílico	Giberilinas totales	Citoquininas totales
0 mg L ⁻¹	0.394 \pm 0.127	0.022 \pm 0.002	0.014 \pm 0.002	4.334 \pm 1.460	0.931 \pm 0.322	0.035 \pm 0.006
10 mg L ⁻¹	0.466 \pm 0.119	0.020 \pm 0.006	0.004 \pm 0.001*	7.029 \pm 0.588	0.588 \pm 0.071	0.042 \pm 0.006

2.4.3.3. Pigmentos fotosintéticos

Los estreses como la sequía, la salinidad y la baja temperatura, inducen efectos metabólicos comunes debido a la actividad del agua dentro de la célula. Una vez que se establece el estrés, se utilizan mecanismos bioquímicos y fisiológicos muy complejos para proteger los procesos como la respiración, la actividad fotosintética y el transporte de nutrientes. La productividad de la planta depende en gran medida del equilibrio entre la fotosíntesis y la respiración (Nunes-Nesi et al., 2011, Araújo et al., 2014).

Los niveles de pigmentos fotosintéticos en hojas de Lotus se determinaron después de una semana de tratamiento con DMPP en el cultivo hidropónico. El contenido de clorofila *a* y *b* de las plantas crecidas con DMPP no presentaron diferencias significativas respecto al control (Figura 4). Del mismo modo, los contenidos de carotenos, al igual que los contenidos de clorofila, no presentaron diferencias significativas entre las plantas control y las crecidas con DMPP. Según, Webb y Fletcher (1996) un descenso en el contenido de pigmentos fotosintéticos es a menudo uno de los primeros síntomas de estrés asociado con la clorosis de las hojas; esta afirmación va en concordancia con los ensayos previos en que dejamos las plantas expuestas al tratamiento con 100 mg DMPP L⁻¹ durante 15 días y se pudo apreciar una defoliación de las hojas; sin embargo, en las plantas crecidas durante una semana con 10 mg DMPP L⁻¹ no fue posible observar síntomas de toxicidad.

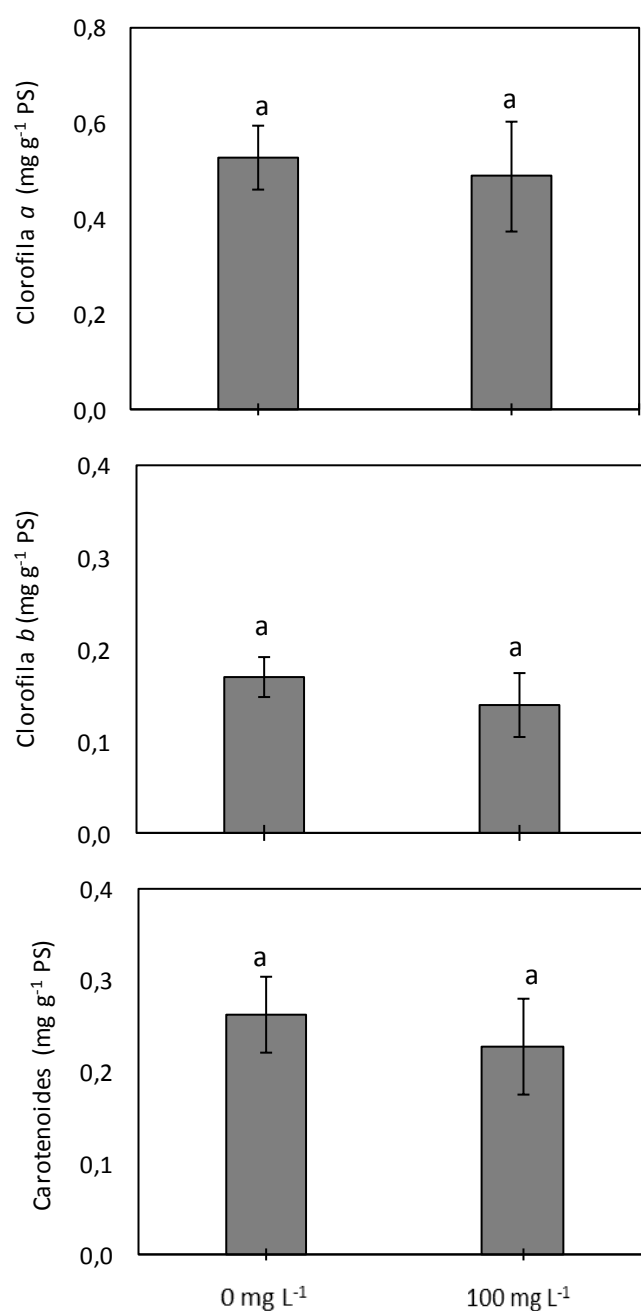


Figura 4. Contenido de clorofila a y b y carotenoides en hojas de Lotus de plantas control y de plantas tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹). Los datos representan el promedio \pm error estándar (n=3), expresados en mg g⁻¹ peso seco.

2.4.3.4. Metabolismo del carbono y nitrógeno

El papel del carbono es de gran importancia en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Varios compuestos de carbono, incluidos ácidos orgánicos, sacarosa, glucosa y otros carbohidratos, proporcionan la energía y los esqueletos carbonados necesarios para la incorporación del N en la célula.

El N forma parte de moléculas clave, como ácidos nucleicos, ATP, aminoácidos, clorofila y varias hormonas vegetales, y funciona como regulador fundamental de numerosos procesos biológicos, incluidos el metabolismo de aminoácidos, la síntesis de proteínas y el metabolismo del carbono (Crawford y Forde, 2002).

Los aminoácidos, las proteínas y particularmente las enzimas son esenciales para casi todas las actividades celulares, incluidas las reacciones metabólicas del metabolismo de nitrógeno y de carbono (Zheng, 2009). Estos compuestos son necesarios para mantener la coordinación entre el metabolismo del C y del N, ya que un equilibrio adecuado entre carbohidratos y compuestos nitrogenados es importante para el crecimiento, el desarrollo y la producción de los cultivos en último término (Coruzzi y Zhou, 2001; Zheng, 2009).

Tabla 8.: Porcentaje de C, N y ratio C/N en parte aérea y raíz de plantas de Lotus control y de plantas tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹). Los valores representan el promedio \pm error estándar (n = 3). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

DMPP		% C	% N	C / N
0 mg L ⁻¹	Parte aérea	41 \pm 0,6 a	6,1 \pm 0,1 a	6,8 \pm 0,2 a
	Raíz	40 \pm 2 a	5,7 \pm 0,5 a	7,1 \pm 0,9 a
10 mg L ⁻¹	Parte aérea	42 \pm 0,2 a	5,9 \pm 0,3 a	7,1 \pm 0,4 a
	Raíz	39 \pm 0,1 a	6,4 \pm 0,2 a	6,1 \pm 0,2 a

En la tabla 8 se representan los porcentajes de C, N y la relación C/N de los tejidos de plantas de Lotus tratadas con 10 mg DMPP L⁻¹ y de plantas control. Es de resaltar que el porcentaje de C y N, en ambos tejidos, se mantuvieron constantes tanto en plantas control como en las tratadas con DMPP.

Consecuentemente la ratio C/N también se mantuvo constante en los distintos órganos. Betti et al. (2012) en el estudio de la respuesta al estrés por sequía en las plantas de *Lotus japonicus*, observaron que el metabolismo primario se encontraba afectado por las condiciones de sequía, con una represión general de los genes que codifican las enzimas del ciclo de TCA; en las plantas tratadas con DMPP los resultados de transcriptómica y proteómica indican que genes relacionados con la sequía se ven afectados, sin embargo, estos autores no determinaron los porcentajes de C y N.

En la figura 5 se muestra el valor de la abundancia natural en ^{15}N que muestran los tejidos de las plantas de *Lotus* crecidas en presencia de 10 mg DMPP L^{-1} con relación a las plantas control. En la parte aérea, los valores de $\delta^{15}\text{N}$ fueron similares en las plantas control y en las tratadas con DMPP, -14,53 y -14,46, respectivamente; sin embargo, se puede observar que la presencia de DMPP influyó de forma significativa sobre el $\delta^{15}\text{N}$ de la raíz respecto al del control, ya que el control presentó un valor de -16,95 frente a -19,98 de las plantas tratadas, produciendo una reducción significativa del contenido de ^{15}N en estos tejidos. Ariz et al. (2011) sugieren que la composición isotópica natural $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) de un tejido es consecuencia de la fuente de nitrógeno que ha sido utilizada por la planta (amonio o nitrato) y de los mecanismos fisiológicos en respuesta al medio, y que este valor puede ser utilizado como un marcador del metabolismo del N en plantas.

El valor menos negativo del $\delta^{15}\text{N}$ (o más enriquecido en ^{14}N) presentado por las plantas control, puede ser asociado con la pérdida de ^{14}N por la planta a través de diferentes procesos: exudados de la raíz, por la pérdida de NH_3 a través de los estomas, etc., procesos que favorecen al isótopo más ligero frente al pesado (Evans, 2001; Yoneyama et al., 2001; Kolb y Evans, 2003). En este sentido, podríamos sugerir que en las plantas tratadas con DMPP se ha favorecido absorción de amonio frente al nitrato, lo que implicaría un empobrecimiento en ^{14}N más acusado que si es el nitrato hubiese sido el preferentemente absorbido. El transporte de amonio por los AMT produce un empobrecimiento en ^{14}N debido al mecanismo de su transporte, donde se produce la discriminación entre el ^{14}N y ^{15}N , especialmente en el proceso de transformación por desprotonación en el transportador AMT de amonio a amoniaco, forma química en la cual el amonio

permea la membrana plasmática de la célula epidérmica de la raíz (Ariz et al., 2018).

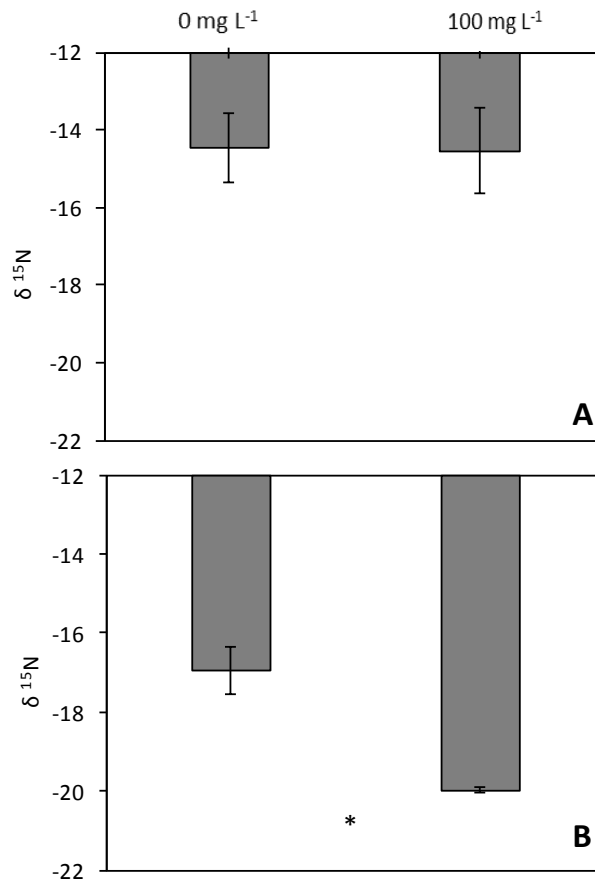


Figura 5. Abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ en plantas de Lotus control y de plantas tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹) en hoja (A) y raíz (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar (n = 3). El asterisco (*) representa diferencias significativas (P \leq 0,05).

El contenido de amonio en la parte aérea de las plantas de Lotus no presentó diferencias significativas entre control y el tratamiento (datos no mostrados), sin embargo, en las raíces el contenido de amonio se vio significativamente afectado, así las plantas control presentaron valores aproximadamente tres veces mayores respecto al tratamiento con el inhibidor DMPP. El contenido de amonio para las raíces fue de $3,62 \pm 0,5$ para control (0 mg L⁻¹) y de $1,34 \pm 0,04$ para 10 mg DMPP L⁻¹. La proteólisis o degradación de proteínas es un proceso que puede estar afectado cuando las plantas entran en la fase de senescencia, resultando en un incremento en el contenido de amonio. Así que un incremento en la degradación de proteína o una inhibición en la asimilación de amonio podrían aumentar el contenido de amonio en los tejidos de las plantas. Sin

embargo, este contenido es resultado del balance de varios procesos que pueden influir tanto positivamente como negativamente en el contenido de amonio en los tejidos. La inducción observada en la actividad GS1 en los análisis de proteómica avala que el amonio liberado por una posible proteólisis se esté reasimilando para evitar efectos tóxicos (Khanna-Chopra, 2012; Diaz-Mendoza et al., 2016).

En la tabla 9, se presentan los contenidos de ácidos orgánicos (malato, citrato y succinato) determinados en plantas de Lotus. El contenido de ácidos orgánicos en la parte aérea no mostró diferencias significativas entre plantas control y tratadas con DMPP, solo se pudieron observar diferencias significativas en el contenido de malato en raíz el cual disminuyó en las plantas tratadas. Aunque el contenido de malato fue más alto respecto a los demás ácidos orgánicos (citrato, succinato, acetato, lactato y α -cetoglutarato, estos tres últimos no detectados) pudimos observar como en las plantas tratadas con DMPP se produce una reducción de malato si bien solo resulta significativa estadísticamente en la raíz y no en la parte aérea; estos resultados difieren de los encontrados por Cruchaga et al. (2013) en plantas de guisante crecidas con amonio como fuente de nitrógeno y tratadas con el inhibidor de la ureasa NPBT donde se observó un aumento de este ácido orgánico en las plantas tratadas frente al control.

Tabla 9. Contenido de ácidos orgánicos (malato, citrato y succinato) en hoja y raíz de plantas de Lotus control y tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹). Los valores representan el promedio \pm error estándar, expresados en $\mu\text{mol g}^{-1}$ peso seco (n = 4). El asterisco representa diferencias significativas (Student t-test $p \leq 0.05$) entre ausencia del inhibidor (0 mg L⁻¹) y dosis de 10 mg DMPP L⁻¹.

	Parte aérea		Raíz	
	0 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	0 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹
Malato	33,6 \pm 9	29 \pm 4	16 \pm 1	13 \pm 1 *
Citrato	12 \pm 7	13 \pm 2	9 \pm 1	8 \pm 1
Succinato	4 \pm 1	2 \pm 0	3 \pm 0	3 \pm 0
Acetato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lactato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α - cetoglutarato	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

El metabolismo de los aminoácidos puede jugar un papel importante en la tolerancia al estrés de las plantas (Rhodes et al., 1999); estos compuestos tienen una amplia gama de funciones en las plantas y también son las unidades estructurales a partir de las cuales se fabrican las proteínas. Según, Cruchaga et al. (2011) cambios en el metabolismo del N que implique una variación en el contenido de aminoácidos es probable que afecte el crecimiento y desarrollo de las plantas

El contenido de aminoácidos libres totales en la parte aérea y raíz de plantas de Lotus control y tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹), no mostraron diferencias significativas, aunque se pudo observar una tendencia inversa en parte aérea y raíz en el contenido de los mismos (Figura 6). En la parte aérea de plantas de Lotus control, el contenido en aminoácidos totales fue de 148 ± 6 nmol g⁻¹ PS frente a 210 ± 37 nmol g⁻¹ PS en las plantas tratadas con DMPP. Por el contrario, en la raíz la tendencia observada, aunque menos acusada que en la parte aérea, fue la inversa que, en la parte aérea, ya que las raíces de plantas control presentaron contenidos totales de aminoácidos de 401 ± 26 nmol g⁻¹ PS frente a los 348 ± 19 nmol g⁻¹ PS de las plantas tratadas con DMPP. El contenido de proteína soluble de los diferentes tejidos de las plantas no varía en presencia del inhibidor DMPP (Figura 7).

Díaz et al. (2005) en un estudio realizado con plantas *Lotus corniculatus*, *L. glaber*, *L. japonicus*, *L. subbiflorus* y *L. uliginosus* expuestas a estrés por sequía observó que los aminoácidos libres totales y el contenido de proteína no se vieron afectados significativamente. Aunque se observa una tendencia en la reducción del contenido de aminoácidos totales en las raíces de Lotus sometidas al tratamiento DMPP, este no es significativo, con lo cual no podemos afirmar si podría haber una mayor degradación o síntesis de proteínas en las plantas con DMPP. En un estudio donde se aplicó un tratamiento con un inhibidor de la ureasa a plantas de espinaca y guisante, se pudo observar una disminución en los niveles de aminoácidos y proteínas solubles (Cruchaga et al., 2011), aunque esto está ligado a una inhibición de la ureasa que interviene directamente con el metabolismo del nitrógeno.

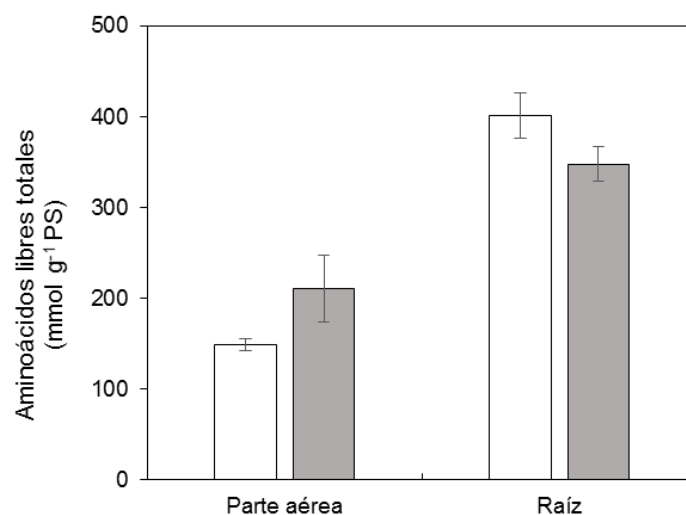


Figura 6. Contenido de aminoácidos libres totales en parte aérea y raíz de plantas de Lotus control (blanco) y tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹) (gris). Los datos representan el promedio \pm error estándar (n=4).

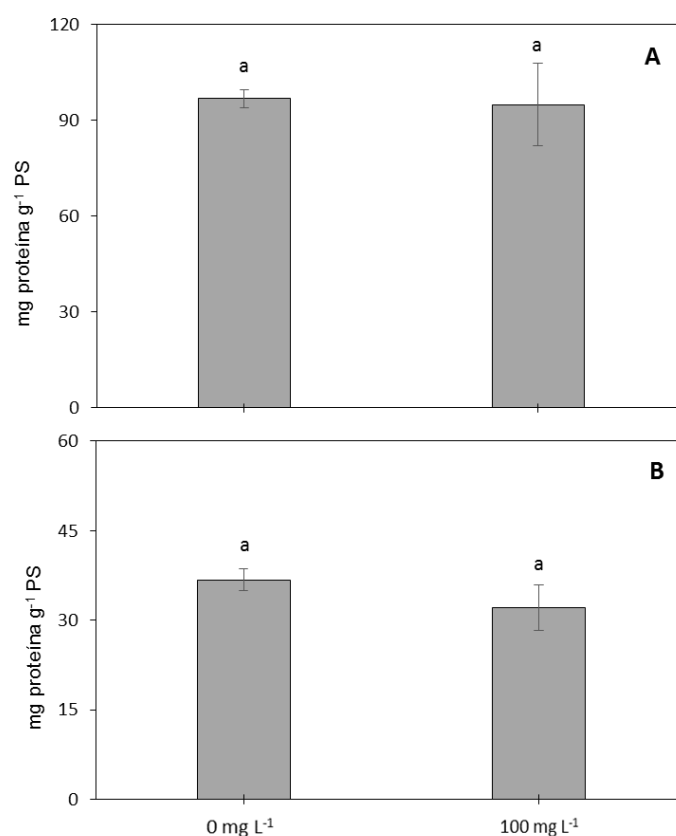


Figura 7. Contenido de proteína soluble en hoja y raíz de plantas de Lotus control y tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹). Los datos representan el promedio \pm error estándar (n=4).

En el análisis del perfil de aminoácidos (Figura 8) de la parte aérea se puede observar que, en presencia del inhibidor, los contenidos de metionina, fenilalanina y GABA se modificaron significativamente incrementándose respecto al control. Entre estos aminoácidos, el GABA es una molécula que puede desempeñar varias funciones como la de regulación del pH celular, la de osmorregulación y la de protección contra el estrés oxidativo (Bouché y Fromm, 2004). También se pudieron observar descensos en los niveles de diferentes aminoácidos, como isoleucina, treonina, serina, glicina y ácido glutámico, si bien estos no han presentado diferencias significativas.

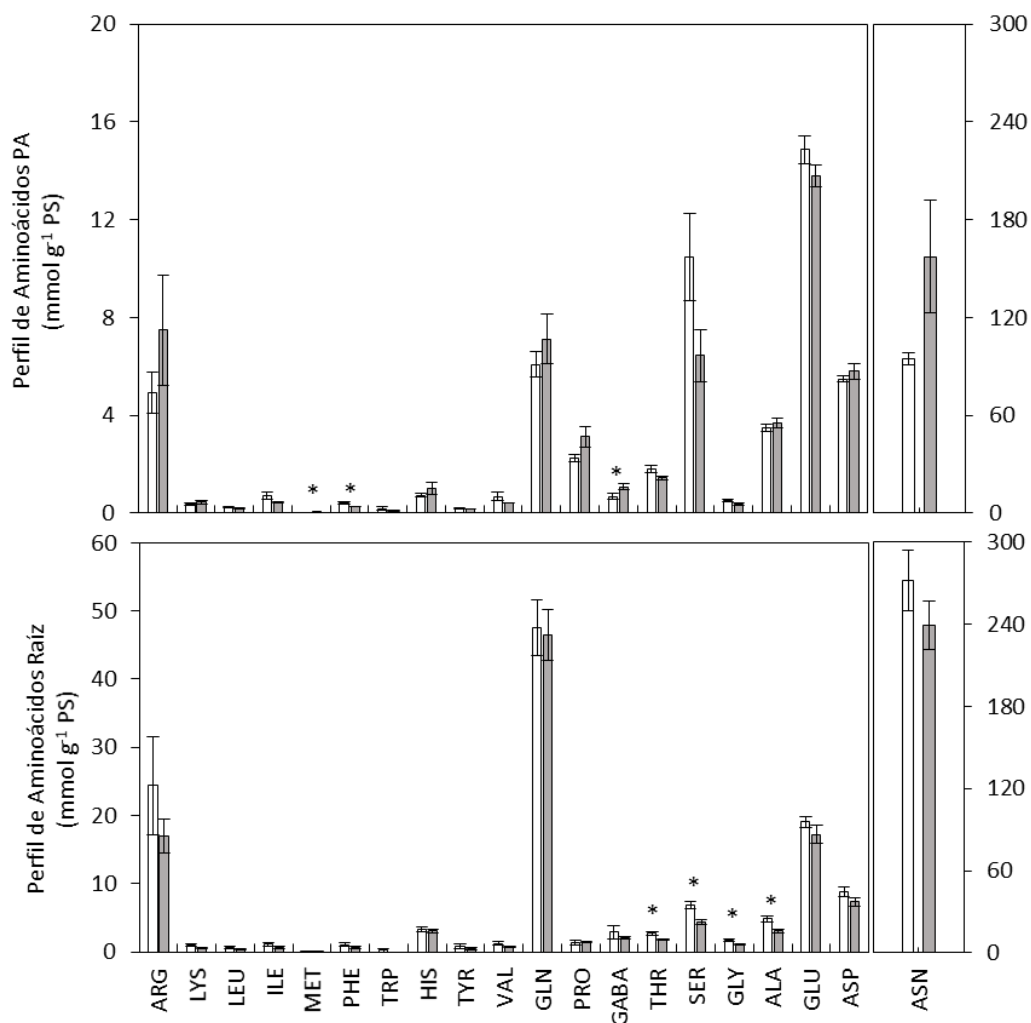


Figura 8. Perfiles de aminoácidos en parte aérea y raíz de plantas de Lotus control (blanco) y tratadas con DMPP (10 mg L⁻¹) (gris). Los datos representan el promedio \pm error estándar (n = 4). Los asteriscos representan diferencias significativas (Student t-test $p \leq 0.05$) entre ausencia del inhibidor (0 mg L⁻¹) y dosis de 10 mg DMPP L⁻¹.

Es interesante destacar que, en las raíces, el contenido de los aminoácidos mayoritarios (Arg, Gln, Glu y Asn) fue más elevado que en la parte aérea, aunque no presentaron diferencias significativas. La asparagina fue la amida más abundante cuantificada en nuestro estudio; esto se puede explicar porque el género *Lotus* está filogenéticamente próximo a la especie *Medicago sativa* en que la asparagina es la principal amida (Girousse et al., 1996). Esta describe la capacidad de las raíces de las leguminosas para exportar asparagina, lo que refleja su capacidad de asimilar nitrógeno que no se observa en las raíces de otras especies (Oaks, 1992). Sin embargo, esta amida no presentó diferencia significativa entre tratamiento y control, resultado también observado por Díaz et al. (2005) en plantas de *Lotus* sometidas a estrés por sequía.

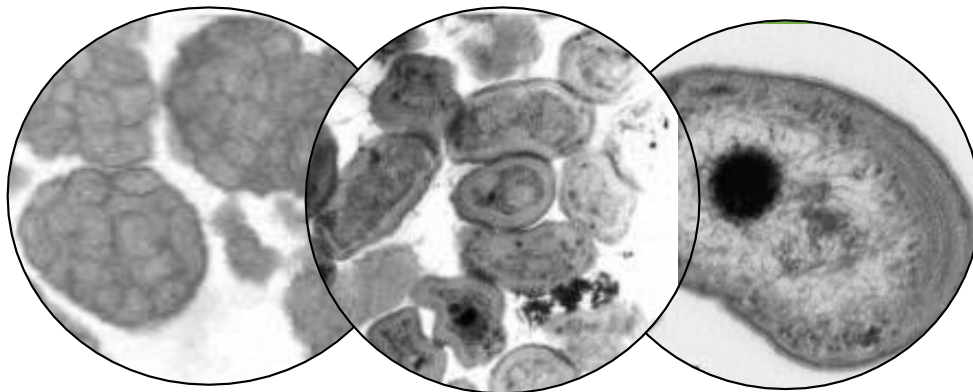
La presencia del inhibidor DMPP provocó una disminución significativa en los niveles de Thr, Ser, Gly. A diferencia de lo observado en la parte aérea, la Arg fue el aminoácido que más disminuyó en la raíz en presencia del DMPP. Díaz et al. (2005) observaron en las hojas de plantas de *Lotus* una disminución en el contenido de alanina y un aumento en el contenido de serina y glicina, que se ha demostrado que es más alta en condiciones de estrés por sequía, ya que la alanina es un importante donante de grupos amino en el metabolismo fotorrespiratorio.

2.5. CONCLUSIONES

El crecimiento de Lotus no se vio afectado por los inhibidores de la nitrificación, DMPP y DMPA, aunque únicamente en presencia de alta dosis de DMPP (100 mg L^{-1}) las plantas presentaron síntomas visuales de toxicidad. Los resultados encontrados en la diferente translocación de los inhibidores podrían estar relacionada con la diferente estructura fisicoquímica de las moléculas, sugiriendo que el DMP es más móvil que el DMPA y por tanto se acumula en un mayor porcentaje en la parte aérea.

En nuestro estudio molecular utilizando técnicas ómicas, como la transcriptómica y la proteómica, hemos observado que el inhibidor DMPP no afecta de forma acusada a la expresión génica ni a la expresión de proteínas. Los resultados sugieren una afectación de metabolismo redox (estrés oxidativo), metabolismo hormonal y metabolismo C y N.

De los parámetros del metabolismo redox analizados únicamente se observó diferencias significativas en la forma oxidada del antioxidante homoglutatión (hGSSG), que se vio incrementado en las plantas tratadas con el inhibidor DMPP y en la peroxidación lipídica radical, la cual observamos que fue menor en presencia del inhibidor. El metabolismo hormonal presentó pocos cambios, únicamente, el ácido jasmónico disminuyó en presencia del inhibidor, resultado que concuerda con la transcriptómica obtenida, donde el gen que codifica para la síntesis de jasmonato está reprimido. Estos aspectos conducen a pensar en que el DMPP puede estar produciendo un cierto estrés oxidativo. Los parámetros analizados para el metabolismo del C y N no se modificaron de forma muy significativa en las plantas cuando se les aporta el DMPP, únicamente el $\delta^{15}\text{N}$ de raíz fue más negativo, o sea se incrementó en el ^{14}N respecto al control y el contenido de amonio en las raíces tratadas con $10 \text{ mg DMPP L}^{-1}$ también disminuyó respecto al control, pudiendo sugerir alteraciones en el metabolismo del N propias de una inducción temprana de la senescencia.



CAPÍTULO 3

**Eficiencia de los inhibidores de nitrificación DMPP y DPMSA
sobre la actividad oxidadora de amonio en aislados de bacterias
nitrificantes de suelos**

3.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de nitrificación ha estado considerado como un componente de importancia menor dentro del Ciclo del Nitrógeno hasta el inicio de la denominada “Revolución Verde”, cuando los fertilizantes nitrogenados de síntesis comenzaron a ser aplicados de forma generalizada en la agricultura. El proceso de nitrificación es catalizado por un conjunto de organismos denominados bacterias y arqueas oxidadoras de amonio (AOB y AOA respectivamente), bacterias oxidadoras de nitrito (NOB), así como las recientemente descritas bacterias oxidadoras completas de amonio en las que una simple bacteria del género *Nitrospira* realiza la oxidación completa del amonio a nitrato (Daims et al., 2015 y van Kessel et al., 2015). Las AOB son bacterias quimiolitotróficas, que tienen como sustrato principal el NH_4^+ y como donante de electrones la hidroxilamina. La AMO, enzima responsable de la primera etapa de la oxidación de amonio en el proceso de nitrificación, produce hidroxilamina, la cual es a su vez oxidada a nitrito por la enzima hidroxilamina oxiredutasa (HAO) (Bock and Wagner, 2006; Hatzenpichler, 2012) y convertido rápidamente a nitrato por la acción de las bacterias del grupo NOB (Figura 1). Así, el nitrato obtenido en este proceso puede ser inmovilizado por los microorganismos del suelo, absorbido por las plantas o emitido por desnitrificación en forma de NO , N_2O y N_2 . La población bacteriana desarrollada en el proceso de nitrificación es determinada por la concentración de NH_4^+ , a concentraciones bajas crece la población de las bacterias del género *Nitrosospira*, mientras que a concentraciones altas la población de las bacterias del género *Nitrosomonas* es mayor (Kox y Jetten, 2015).



Figura 1- Proceso de nitrificación, adaptado de Benckiser et al. (2013).

En los sistemas modernos de producción agrícola, los valores de la actividad nitrificante de los suelos comparados con los sistemas tradicionales se han incrementado muy significativamente (Tilman et al., 2002). Esto ha originado una situación que, a pesar de los avances en el manejo de la aplicación de los fertilizantes nitrogenados, un elevado porcentaje del N aplicado como fertilizante es perdido vía lixiviación de nitrato (Zhou et al., 2016) y vía emisiones gaseosas en forma de N_2O , NO y N_2 con la consiguiente pérdida de eficiencia en el uso del N e impacto ambiental derivado. El N_2O es un gas altamente estable, cuya persistencia en la atmósfera alcanza los 118 años (Prather y Hsu, 2010) y se ha visto aumentado exponencialmente en la era postindustrial principalmente como resultado de la intensificación de la agricultura (fabricación y uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos), al aumento de la quema de combustibles fósiles y al cambio de uso del suelo.

Los inhibidores de la nitrificación (IN), son compuestos tanto de origen biológico como de síntesis química que reducen la pérdida de N por lixiviación del nitrato y emisiones gaseosas. La nitrificación es un proceso biológico que se produce en condiciones aeróbicas (Medinets et al., 2015) y es uno de los contribuyentes de las emisiones de NO y N_2O (Skiba y Smith, 2000; Ussiri y Lal, 2013; Loick et al., 2016). Así, inhibir el primer paso de la nitrificación, ralentizando la oxidación del amonio a nitrito en el suelo causa una reducción directa de las emisiones de óxidos de N, además de aumentar la eficiencia del fertilizante nitrogenado. (Linzmeier et al. 2001; Akiyama et al., 2010; Quemada et al., 2013).

Actualmente existen en el mercado varios compuestos de síntesis con capacidad para inhibir la nitrificación, pero sin embargo los estudios sobre sus posibles efectos fitotóxicos son muy escasos. La 2-cloro-6 (triclorometil) piridina (Nitrapirina), la diciandiamida (DCD) y el 3,4 dimetilpirazol fosfato (DMPP) son en la actualidad los IN más comercializados, aunque continúan apareciendo nuevos productos en el mercado de forma continua. El DCD apareció como alternativa a la Nitrapirina, unos de los primeros compuestos en ser utilizados, tras describirse efectos fitotóxicos de la misma. Sin embargo, estudios recientes han llegado a detectar trazas de DCD en la leche, procedente de vacas que pastaron en prados fertilizados con fertilizantes asociados a este inhibidor de la nitrificación (Kim et al., 2012; Chen et al., 2014). El DMPP tiene la ventaja de ser

utilizado a una concentración 10 veces más baja que el DCD, así como presentar una mayor persistencia en el mantenimiento de la inhibición de la actividad nitrificante (Zerulla et al., 2001).

Muchos procesos físicos y/o bioquímicos (mineralización, absorción microbiana, disponibilidad de agua) pueden influir en la eficacia de los IN (Zhang et al., 2004; Barth et al., 2008; McGeough et al., 2016). La adsorción de IN a la matriz del suelo (es decir, arcillas y materia orgánica) y la inmovilización por microorganismos no diana también se han relacionado con una disminución en la eficacia de los IN. Hasta la fecha, pocos estudios han evaluado estos procesos (Marsden et al., 2016), por lo tanto, es importante comprender las variables clave que afectan la eficacia y el destino de los IN, para elegir el producto más efectivo en cada situación, de acuerdo con puntos de vista de la producción agrícola, salud, economía e implicaciones ambientales.

El DMPP que presenta un elevado potencial de inhibición de las AOB (Beckinser et al., 2003; Zerulla et al., 2001), ha vencido el periodo de protección de su patente, por lo que la empresa fabricante del mismo ha desarrollado un nuevo compuesto mejorado, el 3,4-dimetilpirazol succínico (DMPSA). El nuevo inhibidor, DMPSA, difiere del DMPP en que el primero tiene un grupo succínico, lo que lo hace estable en condiciones básicas y permite combinarlo con otros fertilizantes como nitrato amónico cálcico (CAN) o fosfato diamónico (DAP), da una disponibilidad más suave y prolongada de DMP en el suelo y tiene el mismo efecto inhibidor que el inhibidor de la nitrificación establecido para una concentración más baja (patente CA 2933591 A1 2015/06/18; Pacholski et al., 2016).

Benckiser et al. (2013) han descrito un método de cuantificación de DMPP en suelos, con una sensibilidad de medida de $0,01 \mu\text{g DMPP g suelo}^{-1}$. Estos autores observaron que, tras la aplicación de DMPP a un suelo, se detectaba al final del periodo de cultivo valores superiores al 15% de la cantidad inicial aplicada. Esto nos indica que este compuesto puede permanecer en el suelo y estar disponible para las raíces. Las raíces de las plantas poseen una serie de transportadores específicos y no específicos, para una gran cantidad de elementos (K, Fe, Ca, Mg, Mo, Cu, Zn, Cl, etc.,) moléculas (H_2O , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, etc.,). No obstante,

existen numerosas incertidumbres sobre los mecanismos de transporte implicados, ya que tanto elementos no esenciales para la planta (Al, Cd, Pb, etc.,) como moléculas orgánicas diversas pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas. En el caso de que este tipo de productos asociados a los fertilizantes sean absorbidos por las raíces y translocados a la parte aérea podrían tener efectos colaterales indeseados sobre la fisiología y metabolismo celular. Una molécula utilizada en agricultura como inhibidor de la actividad ureasa del suelo, el N-(n-butil) triamida tiofosfórica (NBPT), se ha demostrado en condiciones de laboratorio, que puede ser absorbida por la planta, teniendo efectos sobre la actividad ureasa de la planta y afectando al metabolismo celular de la misma (Ariz et al., 2012).

3.2. OBJETIVO

En este capítulo, nuestro objetivo es estudiar la eficiencia de los dimetilpirazoles (DMPP y DMPA) sobre la actividad amonio monooxigenasa (AMO) y la hidroxilamina oxidorreductasa (HAO) de microorganismos nitrificantes aislados del suelo.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Determinación de la actividad AMO y HAO en presencia de los inhibidores de la nitrificación

Se realizó un ensayo para determinar la capacidad de inhibición del DMPP y DMPSA sobre la actividad de las bacterias nitrificantes diana (AOB). Teniendo en cuenta que las bacterias AOB son organismos de tamaño pequeño y que las concentraciones celulares alcanzadas en el medio de cultivo son bastante bajas, estas bacterias son muy difíciles de cuantificar con las técnicas clásicas de conteo celular (Farges et al., 2012), por lo que la mayoría de los estudios se basan en cuantificar la producción de nitrito en el medio de cultivo. Los cultivos de las poblaciones AOB se obtuvieron a partir de enriquecimientos secuenciales, donde los medios de cultivo se prepararon de forma que pudiesen permitir un aumento posterior de la población AOB, utilizando el suelo muestreado como inóculo inicial.

En este estudio se ha utilizado muestra de suelo recolectado en mayo de 2013 a partir de un ensayo iniciado en 2007 en el Parque Natural de Arrábida, Natura 2000 al sur de Lisboa, Portugal (PTCON0010 Arrábida / Espichel) establecido para analizar el efecto de la disponibilidad de nitrógeno en la flora del ecosistema. El ensayo está ubicado en un dominio bioclimático termomediterráneo subhúmedo (Dias et al., 2012). Los inóculos utilizados en este experimento se obtuvieron de la parcela sin fertilizar con N (SF) a lo largo de todo el ensayo y de una segunda parcela fertilizada con N (F) donde se aplicó una dosis de 80 kg N ha⁻¹ año⁻¹ en forma de NH₄NO₃.

Cada muestra de suelo se diluyó al 5% (p/v) en 20 ml de medio Synthetic Freshwater Crenarchaeota (SFC) (Konneke et al., 2005; de la Torre et al., 2008), complementado con carbonato de calcio (7,5 g L⁻¹), para tamponar el medio; pimaricina (0,04 g L⁻¹) para prevenir el crecimiento de hongos y clorato de sodio (5 mg L⁻¹) para inhibir el crecimiento de bacterias oxidantes de nitrito. Los inóculos se incubaron en el medio descrito anteriormente a 28 °C sin agitación durante 30 a 90 días. Después, se subcultivaron en la etapa de enriquecimiento secuencial transfiriendo un 5% del cultivo previo (v/v). El enriquecimiento secuencial se repitió 6 veces con el fin de obtener una población

activa y abundante de AOB, ya que el aislamiento de AOB no fue posible. Se considera que el aislado estaba enriquecido en *Nitrosospira* sp. ya que por secuenciación 16S se ha demostrado que los AOB más abundantes en los suelos de la península ibérica pertenecen a este género (Calleja-Cervantes et al., 2015).

El ensayo se estableció en tubos falcón (15 ml) estériles en los que se incorporó 1 ml del stock del cultivo de las bacterias oxidantes del amonio de las dos parcelas (SF y F), 9 ml de medio de crecimiento 240 y 1 ppm de DMPP y DMPSA que fueron disueltos en agua mili-Q. Para ambas procedencias (SF y F) se llevó un control con todo lo anterior a excepción de los inhibidores (DMPP y DMPSA). La concentración de DMPP y DMPSA se fijó en base a la recomendación comercial de que la concentración de ambos compuestos esté al 0,8% del nitrógeno aplicado, siendo en este caso de 5 mM NO_3NH_4 . El medio 240 (NBRC culture collection) contiene de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g L^{-1}), NaCl (0,3 g L^{-1}), K_2HPO_4 (1 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,3 g L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,03 g L^{-1}), CaCO_3 (7,5 g L^{-1}). El medio fue preparado con agua desionizada y esterilizada en autoclave (121°C durante 30 min), el pH final osciló entre 7,9 y 8,2.

Los tubos falcón con los distintos tratamientos se incubaron durante 67 días, en un agitador horizontal a una velocidad de 100 rpm, en oscuridad a 28 °C. En cada muestreo, se tomaron 200 µl de cada cultivo en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. La actividad AMO se estimó cuantificando la desaparición de amonio en el medio, las muestras se tomaron semanalmente y el amonio se cuantificó por el método de Berthelot (Rhine et al., 1988). La actividad HAO se determinó en base al perfil de acumulación de nitrito, usando el método de Griess (Hood-Nowotny et al., 2010).

3.3.2. Determinación de DMPP y DMPSA en el cultivo

Al final del periodo de ensayo (día 67) se determinó la persistencia de los inhibidores (DMPP y DMPSA) tanto en el medio de cultivo (medio centrifugado y filtrado el sobrenadante obtenido) como en el medio de cultivo más el contenido celular bacteriano (medio de cultivo sonicado, centrifugado y filtrado el sobrenadante). El medio sin sonicar y sonicado se utiliza para determinar el contenido de los inhibidores en el medio y en el medio más el contenido en

bacterias. Para ello se tomó 1 ml de los cultivos AOB del cual 0,5 fue sonificado durante 10 min centrifugándose a continuación durante 10 minutos a 10.000 g y 4 °C, a continuación, el sobrenadante se filtró utilizando filtro para jeringa, de nylon de 0,2 µm para eliminar el carbonato del medio y los restos de bacterias. Los 0,5 ml restantes se centrifugaron y filtraron sin sonicar. En los sobrenadantes obtenidos se midió el contenido de DMPP y de 2,3 y 3,4-DMPA, mediante HPLC según se describe en Rodrigues et al. (2018).

3.3.3. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm desviación estándar con un $n = 3$ mediciones independientes y fueron tratados mediante el programa SPSS Statistics versión 23.0 para Windows. La estadística realizada fue *t de Student* con un nivel de significación del 95%.

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Efecto del DMPP y DMPsa en la actividad de las bacterias oxidantes de amonio (AMO y HAO)

Las medidas indirectas de la oxidación del amonio (AMO) y producción de nitrito (HAO), han sido propuestas como métodos indicadores de la actividad potencial nitrificante del suelo (Norton and Stark, 2011) y como aproximación del tamaño de la población de las AOB (Hesselsøe et al., 2001). La nitrificación es muy sensible a factores edáficos como concentración del sustrato, pH, nutrientes, elementos traza, sustancias alelopáticas, etc (Robertson, 1989). McCarty y Bremner, (1990) resaltan que la forma de aplicación del inhibidor puede condicionar el resultado obtenido; así por ejemplo, la adición de Nitrapirina (2-chloro-6- (triclorometilpiridina), al necesitar de un solvente orgánico para su solubilización, antes de agregarla al suelo, este solvente produce un efecto sobre la nitrificación. En nuestro caso, dado que el DMPP y DMPsa pueden incorporarse disueltos en agua, nos garantiza que el efecto que vayamos a obtener sobre las bacterias nitrificantes es del propio inhibidor, sin efectos colaterales.

En la Figura 1 se puede observar el descenso en el contenido de amonio tanto en el aislado del suelo no fertilizado (SF) como del suelo fertilizado (F). Es interesante destacar el descenso más acusado del cultivo control (sin inhibidor) en los aislados fertilizados, indicando probablemente una mayor actividad de bacterias nitrificantes en este medio fruto de la estimulación de la fertilización (Di et al., 2009; Di et al., 2010). El comportamiento de los dos inhibidores es diferente. Así mientras con DMPP se mantiene el amonio en el cultivo, tanto en los aislados fertilizados como en los no fertilizados, el DMPsa inhibe escasamente la actividad AMO y la desaparición del amonio continua en el tiempo al igual que el tratamiento control. Sin embargo, la actividad AMO es mayor en el tratamiento control que en el de DMPsa para suelo sin fertilizar (SF), lo que indicaría una cierta capacidad inhibidora del DMPsa, mientras que para el suelo fertilizado (F), la actividad AMO es menor en el tratamiento control que en el de DMPsa. Se ha descrito que la fertilización continuada provoca cambios tanto en la biomasa como en el tipo de microorganismos del suelo (Shen et al.,

2008; Chen et al., 2011 y Xu et al., 2012) y esto podría explicar nuestros resultados.

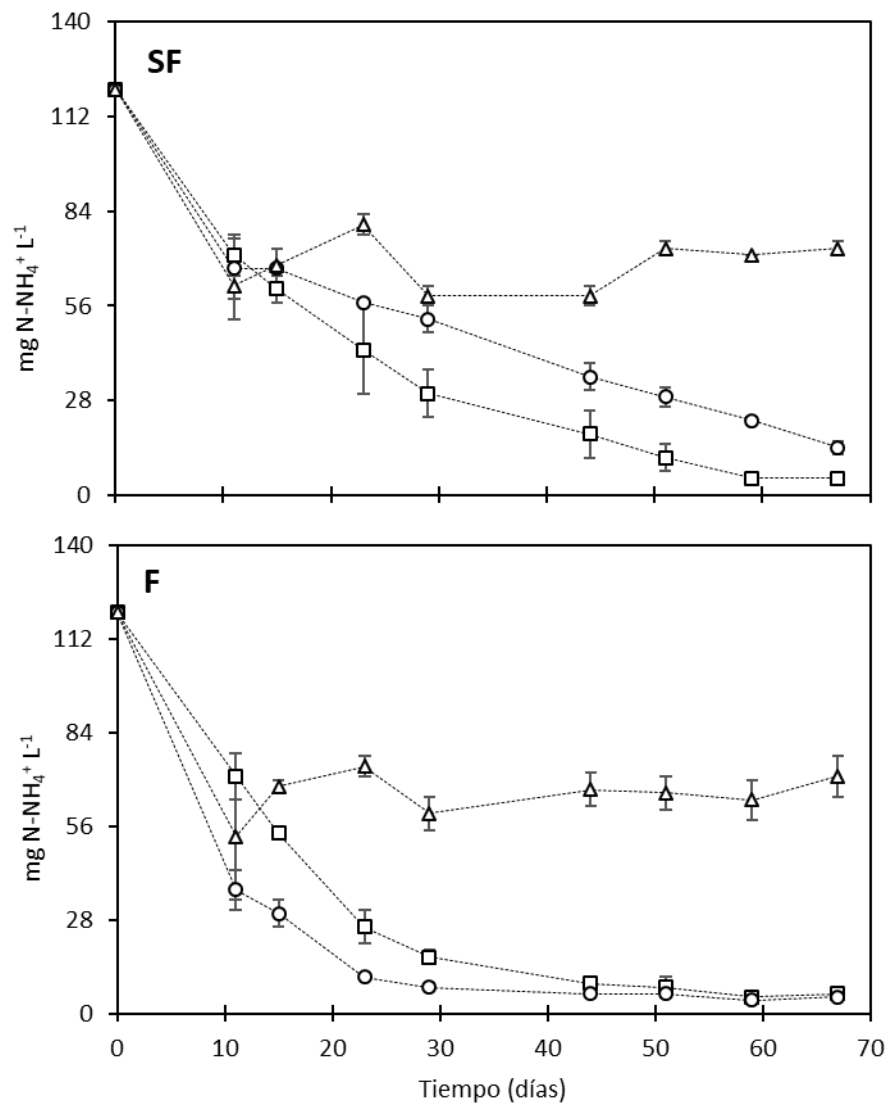


Figura 1. Consumo de amonio en un cultivo de bacterias extraídas de un suelo sin fertilización (SF) y con fertilización (F). Efecto de 1 ppm de DMPP (Δ), 1 ppm de DMP SA (○) y del control sin inhibidor (□) (n=3).

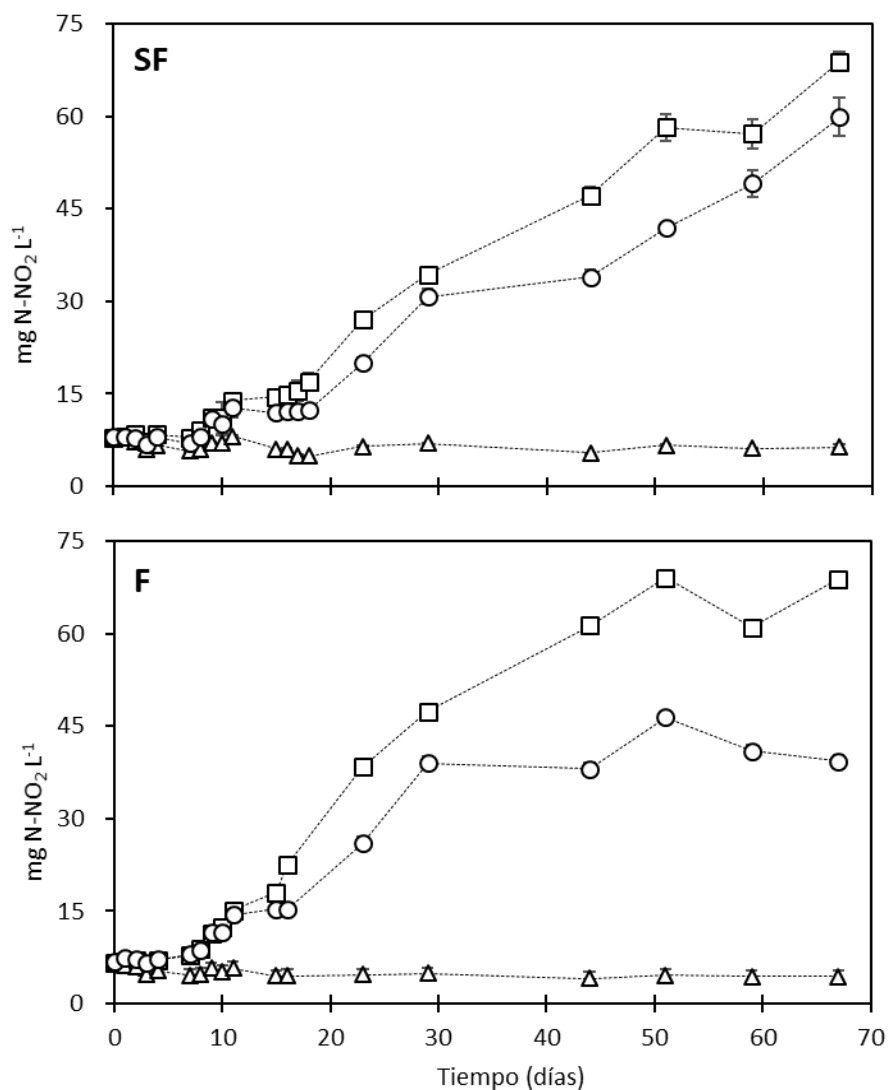


Figura 2. Producción de nitrito en un cultivo de bacterias extraídas de un suelo sin fertilización (SF) y con fertilización (F). Efecto de 1 ppm de DMPP (Δ), 1 ppm de DMPSA (○) y del control sin inhibidor (□).

En la Figura 2 podemos observar la actividad HAO medida como producción de nitrito en el cultivo de ambos aislados de suelo no fertilizado (SF) y fertilizado (F). Es interesante destacar que durante la primera semana de incubación se observó una fase *lag* de la actividad microbiana, ya que la producción de nitrito se mantuvo constante durante ese periodo. Sin embargo, durante este periodo podemos apreciar un descenso significativo de la concentración de amonio en el medio, hasta 62 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ en el cultivo procedente de un inóculo aislado de un suelo sin fertilizar (Figura 1 SF) y hasta 37 mg N-NH₄⁺ L⁻¹ en el aislado del

suelo fertilizado (Figura 1 F). El descenso de amonio sin producción asociada de nitrito puede tener lugar porque parte del amonio es utilizado para el crecimiento de las propias bacterias, incorporándolo directamente en metabolitos nitrogenados constituyentes de la materia orgánica.

Está descrito que el crecimiento de las bacterias AOB es muy lento presentando un rendimiento energético muy bajo y se estima que es necesario oxidar unos 35 moles de amonio para fijar un mol de CO_2 (Bock and Wagner, 2006). Esta energía producida de la oxidación de amonio se invierte en incrementos de la biomasa bacteriana generando fases *lag* de crecimiento (Junier et al., 2010, Farges et al., 2012). Transcurrida esa primera semana, la actividad bacteriana del cultivo control (sin inhibidor de nitrificación) se incrementó significativamente, observándose una producción creciente de nitrito (Figura 2), coincidente con un aumento en el consumo de amonio que se mantiene constante hasta el final del periodo ensayado (Figura1 SF y 1 F).

La producción de nitrito, tanto en los cultivos bacterianos procedentes de aislados de suelos fertilizados (Figura 2 F) como no fertilizados (Figura 2 SF) tratados con DMPP y DMPSA fueron significativamente menores que en el cultivo control, especialmente en el tratamiento con el inhibidor de la nitrificación DMPP. Mientras que la concentración final de nitrito en el medio de cultivo procedente del suelo sin fertilizar (Figura 2 SF) tratado con DMPSA fue de 59 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ frente a 68 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ del control sin tratamiento de inhibidor, la producción de nitrito en el cultivo tratado con DMPP no sufrió variaciones significativas a lo largo de todo el periodo analizado, no superando valores de 7 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ al final del ensayo, que fueron similares a los iniciales. Esta misma tendencia se observa en el medio de cultivo procedente del suelo fertilizado (Figura 2 F), donde si bien de nuevo el DMPP se manifiesta como un potente inhibidor de la actividad HAO inhibiendo la producción de nitrito (4,4 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$), en los cultivos de aislados de suelos fertilizados (Figura 2 F) se observa un mejor comportamiento del DMPSA (39 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$) que en los no fertilizados (59 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$) (Figura 2 SF) siendo la máxima producción de nitrito observada de 69 $\text{mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$ para el control sin inhibidor. Además, es de destacar que, a diferencia del medio de cultivo procedente del suelo sin fertilizar, donde el amonio no es consumido prácticamente casi hasta el final del ensayo,

en el cultivo procedente del suelo fertilizado, el consumo casi total del amonio se produce prácticamente en el día 51 (Figura 1).

Está ampliamente descrito que la fertilización de suelos incrementa de forma muy significativa la carga bacteriana de AOBs (Di et al., 2009; Di et al., 2010), por tanto, es probable que el inóculo obtenido del suelo fertilizado con nitrato amónico frente al suelo no fertilizado durante 7 años contenga una mayor carga bacteriana que haga que la actividad de las mismas alcancen antes la máxima producción de nitrito y el consumo total de amonio. Por lo tanto, bajo nuestras condiciones de ensayo podemos observar una mayor eficiencia en la capacidad de inhibición de la actividad de las bacterias diana por parte del DMPP que del DMPSA.

Respecto a la capacidad del DMPP para inhibir la actividad nitrificante de las AOBs, otros autores han descrito resultados similares; Benckiser et al. (2013) en su estudio utilizando medios de cultivo de bacterias nitrificantes aisladas de suelo, demostraron que en presencia de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$ DMPP, la producción de nitrito era inhibida totalmente alrededor de 75 días de tratamiento. En estudios realizados por LI Hua et al. (2008) con suelos fertilizados con urea y urea más DMPP encontraron que las poblaciones de bacterias oxidantes de amonio de los suelos tratados con DMPP presentaron una disminución de un 30% aproximadamente del NMP de AOB sin que la población de bacterias oxidantes de nitrito (NOB) fuesen afectadas por el DMPP. Asimismo, Dong et al. (2013) observaron una disminución de casi el 100% de la expresión del gen *amoA* respecto a condiciones control sin inhibidor.

Tanto el DCD como el DMPP están considerados IN muy específicos de la enzima amonio monooxigenasa. Di y Cameron (2004) encontraron que con la aplicación del inhibidor de la nitrificación DCD, las pérdidas por lixiviación de nitratos en suelos de pradera bajo pastoreo se redujeron en un 76%, de 85 a 20 $\text{kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ en las zonas de suelo que recibían orina de vaca. Asimismo, otros autores han confirmado que el DCD puede reducir significativamente las pérdidas por lixiviación de nitratos en los pastizales pastoreados (Monaghan et al., 2009; Dennis et al., 2012). Las respuestas de rendimiento a la aplicación de DCD en las zonas de suelo que recibían la orina de los animales se han asociado con aumentos en la absorción anual de N de un 27-37% para la orina depositada

en otoño y de un 46% para la depositada en primavera, respectivamente (Moir et al., 2012). Existen numerosos estudios que muestran que el DMPP presenta algunas ventajas sobre el DCD, destacando la que el DMPP, respecto al DCD, necesita menos de una décima parte de la dosis del DCD para obtener idéntico o incluso un mejor efecto inhibidor de la actividad nitrificante (Zerulla et al., 2001), tanto en la reducción de pérdidas de N tanto por lixiviación de NO_3^- como por emisión de N_2O (Weiske et al., 2001; Macadam et al., 2003; Liu et al., 2013).

Con respecto a la efectividad del nuevo compuesto DMPSA como inhibidor de la nitrificación en comparación con el DMPP, hasta el momento solo hay un único estudio sobre su efectividad en campo realizado por Huérfano et al. (2016). En este estudio, los autores concluyen que, durante dos años consecutivos, las emisiones de N_2O son reducidas de modo eficaz y en igual grado por ambos inhibidores; asimismo los valores de producción del trigo obtenidos en estos ensayos no presentaron diferencias significativas entre las parcelas fertilizadas sin y con el DMPSA o DMPP; lo que parece indicar una similar eficiencia. Sin embargo, en un estudio reciente con poblaciones microbianas nitrificantes y desnitrificantes del suelo bajo dos contenidos de agua del suelo contrastantes (40% y 80% de WFPS) con DMPP y DMPSA, Torralbo et al. (2017) observaron que ambos inhibidores tenían un comportamiento diferente sobre las emisiones gaseosas en función de los espacios porosos llenos de agua en el suelo (WFPS).

Hasta el momento no existe ningún trabajo publicado sobre el efecto directo del DMPSA sobre las bacterias oxidantes de amonio. Los resultados obtenidos por nosotros y para nuestras condiciones de ensayo, indican una mayor eficacia en la acumulación de amonio y disminución de la producción de nitrito, por tanto de la inhibición de la nitrificación, por el DMPP que por el DMPSA, resultado que puede ser debido posiblemente en parte a la diferencia en la estructura química de ambas moléculas. El DMPP en solución se disocia en DMP y Pi , siendo por tanto el DMP la molécula activa en la inhibición de la nitrificación (Benckiser et al., 2013); mientras que la molécula de DMPSA, el Pi es sustituido por el ácido succínico el cual presenta una unión covalente que como hemos verificado, a diferencia del DMPP, no se disocia químicamente en solución acuosa liberando DMP.

3.4.2. Contenido de DMPP y DMPSA en el cultivo

En nuestro ensayo hemos determinado el contenido de los inhibidores DMPP y DMPSA, tanto en el medio de cultivo, como en el medio de cultivo más el contenido celular bacteriano.

Los resultados mostraron que en la cantidad de DMPP y DMPSA no había diferencias dentro de cada tratamiento entre los medios de cultivo sonicados y no sonicados. Esto es probablemente debido a que no somos capaces de discernir la concentración de los inhibidores en el medio y en el medio más el contenido celular bacteriano debido al bajo volumen celular bacteriano. Por lo tanto, los resultados obtenidos se presentan conjuntamente. La determinación tanto de DMPP como de DMPSA al final del periodo de cultivo de los inóculos bacterianos, indica la persistencia de estos compuestos en ambos tipos de cultivo (SF y F). Es de destacar la estabilidad del DMPP, ya que después de 67 días la concentración del producto en los medios de cultivo (SF y F) fue idéntica a la concentración inicial aplicada; sin embargo, el comportamiento del DMPSA fue más errático, con unos contenidos finales (sumando ambos isómeros) de un 54% y un 72% en el cultivo SF y F respectivamente. Es posible que esta inestabilidad es debida en parte a una degradación o inmovilización del DMPSA por parte de las bacterias del cultivo y eso podría explicar su menor efectividad en la inhibición de la nitrificación (Tabla 1).

Tabla 1- Contenido de inhibidores de la nitrificación (DMP, 2,3-DMPSA y 3,4-DMPSA) en un medio de cultivo de bacterias procedentes de su suelo sin fertilización (SF) y fertilizado (F) con nitrato amónico después de 67 días de incubación. Los datos se expresan en ppm (n = 6). "n.d." significa no detectado.

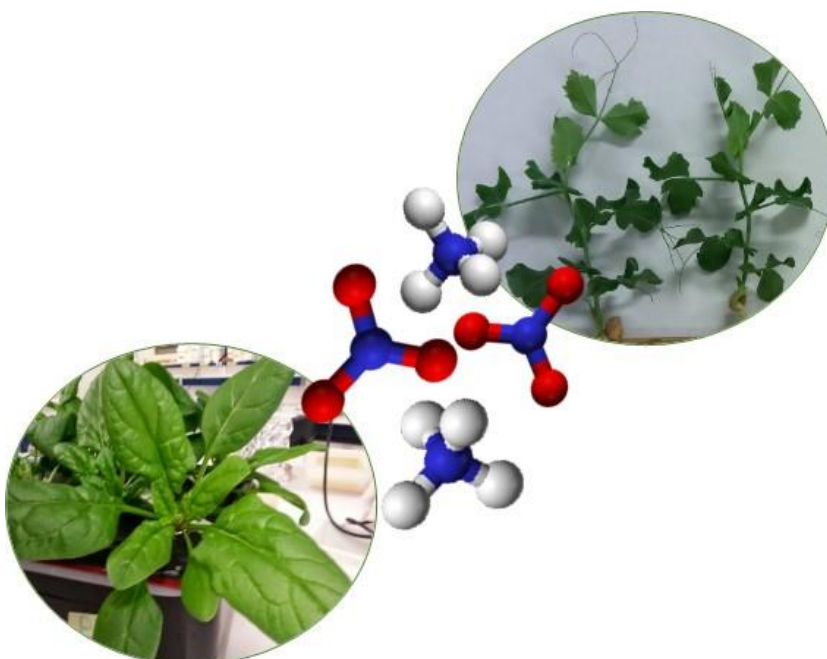
Tratamiento	Cultivo SF			Cultivo F		
	DMP	2,3 DMPSA	3,4 DMPSA	DMP	2,3 DMPSA	3,4 DMPSA
DMPP (1 ppm)	0,982 ± 0,02	n.d.	n.d.	1,049 ± 0,02	n.d.	n.d.
DMPSA (1 ppm)	0,076 ± 0,00	0,228 ± 0,01	0,316 ± 0,03	n.d.	0,113 ± 0,004	0,609 ± 0,018

En los tratamientos con DMPSA se pudo observar que, mientras que en el cultivo F, la razón de los dos isómeros que conforman el DMPSA se mantiene igual que en su formulación comercial 20:80, en el cultivo SF esa proporción cambia a 42:58 y además aparece contenidos traza de 0,076 ppm de DMP, el cual probablemente pueda provenir de la ruptura del enlace entre el ácido succínico y la molécula de DMP. Las diferencias encontradas en las ratios de los isómeros del DMPSA en los cultivos también podrían explicarse por el origen de los inóculos, ya que está descrito que la fertilización de los suelos no solo afecta a las poblaciones de las AOB sino también a los perfiles de AOBs (Yang et al., 2013). Por tanto, los distintos perfiles de AOBs de los inóculos podrían haber tenido influencia sobre esa alteración tanto de la cantidad total del producto determinado al final del periodo de cultivo como de la razón de los isómeros del DMPSA.

3.5. CONCLUSIONES

Los inhibidores de la nitrificación, DMPP y DMPSA, presentaron, en nuestras condiciones de ensayo, distinta respuesta en su efecto sobre la actividad de las bacterias oxidantes de amonio (AMO y HAO). El DMPP mantuvo el amonio en el cultivo durante mucho más tiempo, confirmando su efecto inhibidor en ambos cultivos (sin fertilizar y fertilizado). Sin embargo, el DMPSA prácticamente no presentó actividad inhibidora destacable de la actividad amonio monooxigenasa, no presentando diferencias significativas frente a los cultivos sin inhibidor.

La determinación de los contenidos de DMPP y DMPSA en el medio de cultivo demostró la estabilidad del inhibidor DMPP, ya que la concentración determinada al final del ensayo fue la aplicada al inicio del ensayo. En cuanto al DMPSA, hasta el momento se dispone de poca información de este nuevo inhibidor y principalmente de su efectividad sobre las AOB, lo que pone de manifiesto la necesidad de seguir estudiando la función como inhibidor de la nitrificación de esta nueva molécula.



CAPÍTULO 4

Efecto del nitrato en el crecimiento de plantas con diferente sensibilidad al amonio bajo una nutrición nitrogenada mixta

4.1. INTRODUCCIÓN

En suelos a pH neutros y básicos la nitrificación es muy activa, siendo el ion NO_3^- predominante en el suelo, por lo cual para evitar pérdidas de N por lixiviación se utilizan de abonos estabilizados, inhibidores de la nitrificación u otros inhibidores de liberación lenta. El uso de estos productos químicos va a hacer que la ratio $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en el suelo varíen temporalmente, y consecuentemente que la ratio de amonio respecto al de nitrato se incremente, si bien no constituirá la única fuente de N, será mayoritaria mientras dure el efecto del inhibidor. De modo que resulta de gran interés el estudio de variar las proporciones de nitrato y amonio sobre los cultivos, ya que es necesario tener en cuenta el cambio de nutrición que supone para la planta el uso de estos compuestos.

El que una fuente de N u otra sea mejor para el crecimiento vegetal depende de muchos factores (Kirkby 1981). Mientras que las plantas adaptadas a suelos con bajo potencial redox (suelos con pHs ácidos) tienen preferencia por el amonio, las plantas que prefieren suelos con pH elevados, utilizan preferentemente el nitrato como fuente de N. Tanto la absorción de nitrato por las plantas como su posterior reducción y asimilación están reguladas directa o indirectamente por diversos factores, entre los que destaca la luz y la propia concentración de nitrato, que controlan la síntesis de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. La actividad conjunta de estas dos enzimas produce amonio que es asimilado rápidamente por el ciclo glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT) (Harrison et al., 2000; Mifflin y Habash, 2002). Si bien el nitrato puede ser reducido y asimilado, tanto en raíces como en la parte aérea (se transporta por el xilema pudiendo ser acumulado en las hojas), el amonio es un compuesto tóxico para la mayoría de las células y, por esta razón en muchas especies vegetales, no es transportado ni almacenado como tal, sino que es rápidamente asimilado en las raíces, según es absorbido, hacia compuestos orgánicos con grupos amino, especialmente aminoácidos (Mifflin y Lea, 1980; Cren y Hirel, 1999). Según Britto y Kronzunker (2002), la sensibilidad al amonio puede ser un fenómeno universal, ya que se ha observado en todos los organismos vivos. No obstante, el grado de los síntomas inducidos por el amonio es variable en las diferentes especies vegetales.

La base fisiológica para la tolerancia al amonio no es completamente conocida, y varía dependiendo de las especies vegetales. Se sabe que la metabolización del amonio en la raíz o la potencial actividad GS y glutamato deshidrogenasa (GDH) en el tejido radical durante el día o la noche favorece el desarrollo de la planta en presencia de amonio (Lasa et al., 2002; Cruz et al., 2003). Una mayor capacidad en la asimilación de N inorgánico en la raíz hace que el transporte de amonio hacia los órganos más sensibles como hojas sea más bajo. La asimilación y reasimilación del amonio en plantas es un proceso bastante complejo. Se han descrito varios genes que codifican para las diferentes isoformas GS y GDH que pueden ser diferencialmente expresados en hojas o en raíz. La comparación de la asimilación y reasimilación del amonio en plantas sensibles y tolerantes a la nutrición amoniaca podría clarificar los mecanismos de tolerancia en la nutrición vegetal.

Las fuentes de nitrógeno inorgánico combinadas y disponibles para las plantas en los suelos agrícolas, son principalmente una mezcla de nitrato y amonio, siendo el nitrato la forma predominante en suelos bien aireados debido al proceso de nitrificación realizado por un grupo específico de bacterias. La nitrificación consiste en la oxidación del amonio a nitrito y este a nitrato en suelos húmedos y cálidos de pH casi neutro. Sin embargo, en muchos suelos fríos, ácidos o hipóxicos, las bacterias nitrificantes son menos eficientes y abundantes haciendo que el amonio se comporte como una fuente nitrogenada más importante que el nitrato (Mengel y Kirkby, 1987), pudiendo conducir a una disminución en la producción de biomasa si las plantas no están adaptadas a la nutrición amoniaca (Macadam et al., 2007).

En la actualidad la eficiencia de la aplicación de fertilizantes nitrogenados sigue siendo baja, ya que el N aplicado es perdido a través de procesos como la volatilización de amoníaco (NH_3), la lixiviación de NO_3^- y los procesos de nitrificación y desnitrificación a través de los cuales se generan pérdidas gaseosas en forma de N_2 , N_2O y NO (Oenema et al., 2007). La nutrición mixta de N que incluye NO_3^- y NH_4^+ generalmente garantiza un mayor rendimiento en la producción de los cultivos que el NO_3^- o el NH_4^+ cuando se aplican aisladamente (Macadam et al., 2007; Helali et al., 2010; Garnica et al., 2010). Muchas de las variedades de cultivos utilizadas en la actualidad han sido

genéticamente seleccionadas para una nutrición nítrica o mixta y, por lo tanto, no están adaptadas al amonio.

La respuesta del crecimiento de las plantas a las fuentes mixtas de N depende en parte de las especies vegetales, de las interacciones entre la adquisición de nitrato o amonio y de múltiples variables ambientales, como la temperatura, el pH del suelo y el suministro de nutrientes (Britto y Kronzucker, 2013).

La asimilación de amonio por parte de las plantas es un proceso energéticamente menos costoso para la célula que la asimilación de nitrato, ya que este, una vez absorbido tiene que ser reducido a amonio y este proceso de reducción requiere un gasto energético que en el caso de las plantas crecidas con amonio es suprimido (Salcac et al., 1987). Sin embargo, la acumulación de amonio puede tener por lo tanto efectos tóxicos cuando es utilizado como única fuente de N para las plantas, dando lugar al denominado “síndrome amoniacal”, algunos de cuyos síntomas son la reducción del crecimiento y de las tasas de fotosíntesis, aparición de clorosis en hojas, acidificación de la rizosfera o la reducción de la absorción de cationes importantes como el K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} (Salsac et al., 1987; Lewis, 1992; Britto y Kronzucker, 2002). Por el contrario, la toxicidad de NO_3^- es bastante poco común y, por lo general, se produce a concentraciones de este ion en el suelo mucho más altas (Britto y Kronzucker, 2005b). Entre las estrategias utilizadas por las plantas para disminuir la cantidad de NH_4^+ libre en los tejidos se encuentra una mayor asimilación de NH_4^+ , que debe ser metabolizado por la célula lo más rápidamente posible para evitar su libre acumulación en los tejidos.

En relación con el metabolismo nitrogenado, se ha manejado la hipótesis de que la tolerancia de las plantas al amonio depende de la disponibilidad de esqueletos carbonados, entre otros factores, para la incorporación del NH_4^+ en compuestos orgánicos. La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) es una enzima ubicua implicada en una amplia variedad de procesos fisiológicos importantes del metabolismo vegetal. Aparte de su destacado papel en la fotosíntesis en plantas C4 y CAM, otra función más general consiste en el abastecimiento de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) para mantener la síntesis de aminoácidos a través de una ruta anaplerótica (Stitt et al., 2002). En este sentido, Sagi et al. (1998) observaron en plantas de raigrás crecidas con

amonio, que la actividad PEPC era mayor en la raíz que en la parte aérea, mientras que la concentración de ácidos orgánicos era más alta en la parte aérea. Estos resultados sugieren que una gran parte de los ácidos orgánicos de la raíz se usan como esqueletos carbonados para las reacciones de transaminación. Por otra parte, Fernandes y Rossiello (1995) describieron que la nutrición amoniacal aparte de aumentar la toma de aniones incrementaba la ratio N-amino/proteína mientras que se reducían los niveles de carbohidratos.

Diversos autores comprobaron que el nitrato puede tener un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las plantas crecidas con amonio (Garnica et al., 2009; Helali et al., 2010; Garnica et al., 2010). Bajo condiciones de nutrición mixta, cuando las plantas se suplementan con nitrato y amonio simultáneamente, la absorción de nitrato puede ser inhibida por la presencia de amonio, sin embargo, el proceso opuesto no parece que tenga lugar (Serna et al., 1992). Por lo que la hipótesis planteada en el presente capítulo es verificar, si la presencia de nitrato como fuente de N conjuntamente con amonio, es capaz de revertir los efectos negativos sobre el crecimiento de plantas de guisante y espinaca cuando ambas especies crecen exclusivamente con amonio y si ambas especies con diferente tolerancia al amonio presentan la misma respuesta.

4.2. OBJETIVO

El objetivo del presente capítulo es estudiar el efecto de la presencia del nitrato en la nutrición amoniacal de dos especies de interés agrícola como el guisante y la espinaca, las cuales tienen diferentes grados de sensibilidad a la nutrición amoniacal. En particular, se estudia la respuesta en crecimiento y parámetros de metabolismo del nitrógeno en plantas crecidas con distintas ratios de nitrato y amonio como fuentes de nitrógeno.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Material vegetal

ESPINACA (*Spinacea oleracea* L. cv. gigante de invierno)

La espinaca es una planta anual, herbácea, dicotiledónea, perteneciente a la familia Quenopodiáceae. Las hojas, de color verde oscuro y lisas, se insertan en forma de roseta en un tallo corto. El sistema radicular es muy fino y poco profundo. La espinaca es capaz de soportar temperaturas por debajo de 0 °C, aunque si estas persisten durante mucho tiempo, además de originar lesiones foliares, producen una detención total del crecimiento, por lo que el cultivo no rinde lo suficiente. La temperatura mínima mensual de crecimiento es de aproximadamente 5 °C. La adaptabilidad a las temperaturas bajas es de gran importancia práctica, dado que la mayor demanda de esta verdura coincide con el período otoñal-primaveral.

Es una especie bastante exigente en cuanto a suelo y prefiere terrenos fértiles, de buena estructura física y de reacción química equilibrada. Por tanto, el terreno debe ser fértil, profundo, bien drenado, de consistencia media, ligeramente suelto, rico en materia orgánica y nitrógeno, del que la espinaca es muy exigente. En suelos ácidos con pH inferior a 6,5 se desarrolla mal, a pH ligeramente alcalino se produce el enrojecimiento del pecíolo y a pH muy elevado es muy susceptible a la clorosis.

La espinaca es una especie nitrófila que mayoritariamente utiliza el nitrógeno en forma de nitrato como la mayoría de las plantas cultivadas y que responde positivamente al incremento de la cantidad de éste en el campo. Es considerada de las especies con mayor capacidad para acumular nitrato en sus tejidos lo que supone un potencial riesgo de toxicidad al ser una hortaliza de consumo de hoja. Por otra parte, es una especie considerada altamente sensible a la nutrición amoniacal, sensibilidad que se refleja en la reducción del crecimiento de hasta un 80 % cuando el amonio es aportado como única fuente de nitrógeno.

GUISANTE (*Pisum sativum* L cv. sugar-snap)

El guisante es una planta herbácea, anual, dicotiledónea, perteneciente a la familia Leguminosae. Posee una germinación hipogea con sistema radical poco

desarrollado, formado por una raíz axonomorfa y múltiples raíces laterales finas. Los tallos son trepadores y angulosos; las hojas tienen pares de foliolos y terminan en zarcillos. Las flores son de morfología típicamente papilionácea, simetría zigomorfa y constan de 5 pétalos y 5 sépalos; pueden aparecer solitarias o formando racimos y presentan principalmente fecundación autógama. El fruto del guisante es una legumbre monocarpelar que incluye a las semillas en número variable y diversas formas globulosas, rugosas y redondeadas.

Es un cultivo de clima templado y algo húmedo. La planta se huela con temperaturas por debajo de 3 ó 4°C. Detiene su crecimiento cuando las temperaturas empiezan a ser menores de 5 ó 7°C. El desarrollo vegetativo tiene su óptimo de crecimiento con temperaturas comprendidas entre 16 y 20 °C, estando el mínimo entre 6 y 10 °C y el máximo en más de 35 °C.

El guisante crece bien en los suelos ligeros de textura silíceo-limosa. En los suelos calizos puede presentar síntomas de clorosis y produce semillas de consistencia dura. Se desarrolla mal en los suelos demasiado húmedos y en los excesivamente arcillosos; agradece la humedad del suelo, pero no en exceso, en los que es frecuente la pudrición de la semilla, originándose nacencias largas, sobre todo si se trata de variedades de grano rugoso. El pH que mejor le va está comprendido entre 6 y 6,5.

Se trata de un cultivo poco exigente en abonos minerales ya que, por ser una especie fijadora de nitrógeno, presenta la capacidad de poder obtener el nitrógeno necesario para su desarrollo, mediante la utilización del nitrógeno molecular presente en la atmósfera. Este proceso se denomina fijación simbiótica de nitrógeno y tiene lugar en unas estructuras localizadas en las raíces de las leguminosas denominadas nódulos, que se forman como consecuencia de la asociación simbiótica entre la planta y los rizobios.

4.3.2. Condiciones de crecimiento

En este ensayo se utilizaron plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L., cv. Gigante de Invierno) considerada especie sensible al amonio y plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Sugar-snap) considerada especie tolerante al amonio.

Las semillas de espinaca no necesitaron ser esterilizadas, y se germinaron en bandejas con una mezcla de vermiculita:perlita (2:1) durante 7 días, siendo regadas cada 48 h con agua desionizada. Una vez germinadas se seleccionaron plántulas homogéneas que hubiesen alcanzado el mismo estadio fenológico y se pusieron en un sistema de cultivo hidropónico puro. El cultivo hidropónico se realizó en tanques de 8 litros de capacidad, en los que se colocaron 8 plantas por tanque. Se colocaron bombas de membrana en cada uno de los tanques con el fin de oxigenar los recipientes, y permitir el desarrollo adecuado del sistema radicular.

Los tanques se dispusieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad, una temperatura de 22/16 °C día/noche, una humedad relativa de 60-70%, y una intensidad de luz de 350 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Las plantas de espinaca crecieron durante tres semanas bajo estas condiciones. La solución nutritiva base para todos los tratamientos fue la descrita por Rigaud y Puppo (1975) modificada (1,15 mM K_2HPO_4 ; 2,68 mM KCl ; 0,7 mM CaSO_4 ; 0,07 mM $\text{Na}_2\text{Fe-EDTA}$; 0,85 mM MgSO_4 ; 16,5 μM Na_2MoO_4 ; 3,7 μM FeCl_3 ; 3,4 μM ZnSO_4 ; 16 μM H_3BO_3 ; 0,5 μM MnSO_4 ; 0,1 μM CuSO_4 ; 0,2 μM AlCl_3 ; 0,1 μM NiCl_2 ; 0,06 μM KI). La solución nutritiva fue renovada cada 4 días. El pH de la solución fue ajustado con H_2SO_4 al 30% para un valor de $6 \pm 0,5$. Los tratamientos se establecieron en función de la fuente nitrogenada suministrada, NO_3^- como $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y NH_4^+ como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. En todos los tratamientos el ion sulfato permaneció descompensado para poder equiparar el aporte de calcio en las soluciones ya que, según estudios comparativos de nutrición nitrogenada, nítrica y amoniacal, el sulfato no interfiere de forma significativa en la absorción de otros iones (Mengel y Kirkby, 1978; Lasa et al. 2001). La concentración final de N para espinaca fue de 5 mM suministrada a distintos ratios según se describe en la Tabla 1.

Tabla 1- Concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en las distintas ratios aplicadas en plantas de espinacas, aporte de sulfato y calcio con las sales de las fuentes de nitrógeno para cada tratamiento y compensación de calcio mediante la adición de CaSO_4 .

Espinaca		Concentración añadida con el tratamiento		Concentración añadida para compensar el Ca^+
$[\text{NH}_4^+]$	$[\text{NO}_3^-]$	SO_4^{2-}	Ca^{2+}	CaSO_4
0 mM	5 mM	-	2,5 mM	-
1,25 mM	3,75 mM	0,625 mM	1,875 mM	0,625 mM
2,5 mM	2,5 mM	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
3,75 mM	1,25 mM	1,875 mM	0,625 mM	1,875 mM
5 mM	0 mM	2,5 mM	-	2,5 mM

Las semillas de guisante se esterilizaron previamente para evitar la formación de nódulos en las raíces mediante el método de Labhili et al. (1995). Se realizó un lavado con agitación durante 40 minutos en una mezcla de hipoclorito de sodio 1% (p/v). Transcurridos estos minutos se aclararon con agua desionizada y se embebieron en una solución de HCl 0,01 N con agitación durante 10 minutos. Las semillas de guisante se germinaron al igual que las de espinaca en bandejas con una mezcla de vermiculita: perlita (2:1) durante 10 días, siendo regadas cada 48 h con agua desionizada. Una vez germinadas, se seleccionaron las plántulas homogéneas que alcanzaron el mismo estadio fenológico y se pusieron en el sistema de cultivo hidropónico puro. Al igual que con la espinaca, el cultivo hidropónico se realizó en tanques de 8 litros de capacidad, en los que se colocaron 8 plantas por tanque. La solución nutritiva fue renovada cada 4 días. Las condiciones de crecimiento fueron las mismas que las fijadas para la espinaca, excepto que el periodo de crecimiento de las plantas de guisante fue de 2 semanas, y la concentración final de N en la solución nutritiva fue de 10 mM en lugar de 5 mM, como fue en el caso de la espinaca. Al igual que en el caso de la espinaca, en todos los tratamientos, el ion sulfato permaneció descompensado para poder equiparar el aporte de calcio en las soluciones. (Tabla 2).

Tabla 2- Concentraciones de NO_3^- y NH_4^+ en las distintas ratios aplicadas en plantas de guisante, aporte de sulfato y calcio con las sales de las fuentes de nitrógeno para cada tratamiento y compensación de calcio mediante la adición de CaSO_4 .

Guisante		Concentración añadida con el tratamiento		Concentración añadida para compensar el Ca^+
$[\text{NH}_4^+]$	$[\text{NO}_3^-]$	SO_4^{2-}	Ca^{2+}	CaSO_4
0 mM	10 mM	-	5 mM	-
2,5 mM	7,5 mM	1,25 mM	3,75 mM	1,25 mM
5 mM	5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
7,5 mM	2,5 mM	3,75 mM	1,25 mM	3,75 mM
10 mM	0 mM	5 mM	-	5 mM

La dosis final utilizada de 10 mM para guisante y 5 mM para espinaca se seleccionó debido a estudios previos (datos no mostrados) en los cuales vimos que una dosis de 10 mM para espinaca cuando se aporta solo amonio como fuente de N era demasiado toxica y las plantas morían.

4.3.3. Medida del crecimiento

Al final del periodo de crecimiento, se determinó el crecimiento en 8 plantas, calculando el peso seco de parte aérea y raíz por separado, tras secar el material en una estufa a 70°C durante 48 h. El resto de las plantas se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido, parte aérea y raíz por separado y se almacenaron a -80°C para posteriores análisis.

4.3.4. Determinación del contenido de carbono y nitrógeno total en la planta y estimación de la eficiencia del uso del N (NUE)

Los porcentajes de N y C en las muestras de material vegetal se determinaron mediante un analizador elemental (CNS 2500, CE Instruments, Milán, Italia). Se pesaron en cápsulas de estaño de 1 a 3 mg de materia seca de las muestras previamente molidas, posteriormente las capsulas se sellaron y se dispusieron en el muestreador del analizador elemental, donde se oxidaron mediante una combustión Dumas, dando lugar a una mezcla de gases, N_2 , CO_2 y H_2O ; el vapor de agua producido es retenido en una trampa de anhidrona (perclorato de

magnesio anhidro) y los gases N₂ y CO₂ fueron detectados por conductividad térmica. La acetanilida se utilizó como estándar, permitiendo crear una recta de calibración y obtener así, directamente, el % N y % C en la composición másica de las muestras. La relación C/N se ha calculado a partir de los datos porcentuales de N y C.

Muchas definiciones de la eficiencia del uso del nitrógeno (NUE) están descritas en la literatura y pueden aplicarse en diferentes situaciones (Hawkesford, 2017). En nuestro caso, la NUE para las plantas de espinaca y guisante, se determinó a partir de los datos del porcentaje de N (g N 100 g⁻¹ PS) y de la biomasa en PS (g) utilizando la razón:

$$\text{NUE} = \text{g PS} / \text{g N absorbido}$$

4.3.5. Determinación isotópica ($\delta^{15}\text{N}$)

El $\delta^{15}\text{N}$ se determinó simultáneamente al contenido en C y N descrito anteriormente mediante un analizador elemental (CNS 2500, CE Instruments, Milán, Italia), este está acoplado mediante una interfaz (ConFloII, Finnigan) a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (TermoQuest Finnigan model Delta plus, Bremen, Alemania).

Las $\delta^{15}\text{N}$ se define como la diferencia relativa de la relación isotópica ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) entre una muestra dada (R_m) y un estándar internacional (R_{st}) (Tcherkez y Hodges, 2008) como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\delta (\text{‰}) = \frac{R_m - R_{st}}{R_{st}} \times 1000$$

4.3.6. Determinación del contenido en plantas de NO₃⁻, NH₄⁺ y K⁺ solubles

El contenido de los iones solubles (NO₃⁻, NH₄⁺ y K⁺) fue extraído a partir de muestras de 0,2 g de tejido vegetal congelado (hojas y raíces). A los tubos conteniendo las muestras congeladas se les añadió 1 mL de agua mili-Q y se incubaron inmediatamente en un baño a 80°C durante 5 min, a continuación, se centrifugaron a 20.000 g durante 20 minutos, recogándose los sobrenadantes y

guardándose a -20°C para la determinación del contenido iónico celular por cromatografía iónica.

El contenido de cationes solubles (K^{+} y NH_4^{+}) de las muestras fue determinado de acuerdo con Ariz et al. (2011), mediante un método isocrático, utilizando como eluyente una solución de 20 mM de ácido metanosulfónico en un cromatógrafo iónico Dionex-DX 500 IC (Dionex Corporation, CA, EE.UU) dotado con una pre-columna Ion Pac CG12A, una columna Dionex Ion-Pac CS12A y una columna supresora Dionex CSRS Ultra II (4 mm). La detección se realizó utilizando un detector electroquímico ED 40 (Dionex). Los extractos fueron diluidos 1:10.

El contenido de NO_3^{-} fue determinado de acuerdo con Ariz et al. (2011), mediante un método de gradiente con eluyente NaOH (de 0,2 mM a 35 mM), en un cromatógrafo iónico DX-500 IC (Dionex Corporation, CA, EE.UU) dotado con una pre-columna Dionex Ion-Pac AG11, una columna Dionex Ion-Pac AS11 y una columna supresora Dionex ASRS Ultra II (4 mm). La detección se realizó utilizando un detector electroquímico ED 40 (Dionex). Los extractos fueron diluidos 1:10.

4.3.7. Cinéticas de absorción de nitrato y amonio

El estudio de cinéticas de absorción de nitrato y amonio se realizó utilizando plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L., cv. Gigante de Invierno) y plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Sugar-snap), crecidas bajo las condiciones descritas anteriormente (apartado 4.2.2) con la modificación de los tratamientos aplicados. En este caso las plantas crecieron durante una semana el guisante y dos semanas la espinaca con una solución nutritiva que contenía 0,25 mM de nitrato y 0,25 mM de amonio. Se realizó un cambio de la solución nutritiva 48 h antes de realizar la cinética de absorción, donde la solución nutritiva estaba libre de N.

La cinética de absorción de nitrato y amonio, cuando ambas fuentes de N se aportan juntas a concentraciones equivalentes, se realizó utilizando las sales enriquecidas al 60% en ^{15}N . En una tanda se usó nitrato enriquecido y amonio no marcado para detectar el enriquecimiento en la raíz debido a la absorción de nitrato y en otra tanda se usó amonio enriquecido y nitrato no marcado para detectar el enriquecimiento en la raíz debido a la absorción de nitrato. El ensayó

se realizó en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa. Las plántulas tanto de espinaca como de guisante fueron introducidas en erlenmeyer de 50 ml conteniendo 35 ml de solución nutritiva libre de N diluida 10 veces, el volumen utilizado permitía sumergir totalmente las raíces en la solución. Una vez colocada la planta, la boca del Erlenmeyer fue sellada con pasta selladora alrededor del cuello de las plantas. Levantando el sellado, se inyectó en la solución, 1 ml de una solución concentrada de amonio y nitrato (marcado en una tanda el amonio y en otra el nitrato) con una concentración final de 5 mM ($2,5 \text{ mM NH}_4^+; 2,5 \text{ mM NO}_3^-$) para espinaca y con una concentración final de 10 mM ($5 \text{ mM NH}_4^+; 5 \text{ mM NO}_3^-$) para guisante. Una vez añadido el tratamiento se coloca rápidamente el sellado garantizando que no se produzca una pérdida de N por volatilización de amoniaco. La toma de muestras fue realizada a distintos tiempos de incubación con los tratamientos: 0, 3, 7, 15 y 30 minutos, con 3 repeticiones para cada tratamiento. En los distintos tiempos, las plantas se sacaron de los Erlenmeyer y las raíces fueron lavadas durante 30 segundos con abundante agua desionizada. El material vegetal fue secado a 70°C durante 48 horas, parte aérea y raíz por separado, posteriormente se analizó el marcaje de ^{15}N presente en las raíces mediante la determinación del $\delta^{15}\text{N}$ de las muestras tomadas a los distintos tiempos con el fin de expresar la cinética de absorción de las formas nitrogenadas. Además, se midió en el tiempo final el $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea con el objetivo de estimar la translocación del N absorbido. El $\delta^{15}\text{N}$ se determinó según lo descrito el apartado 4.2.5.

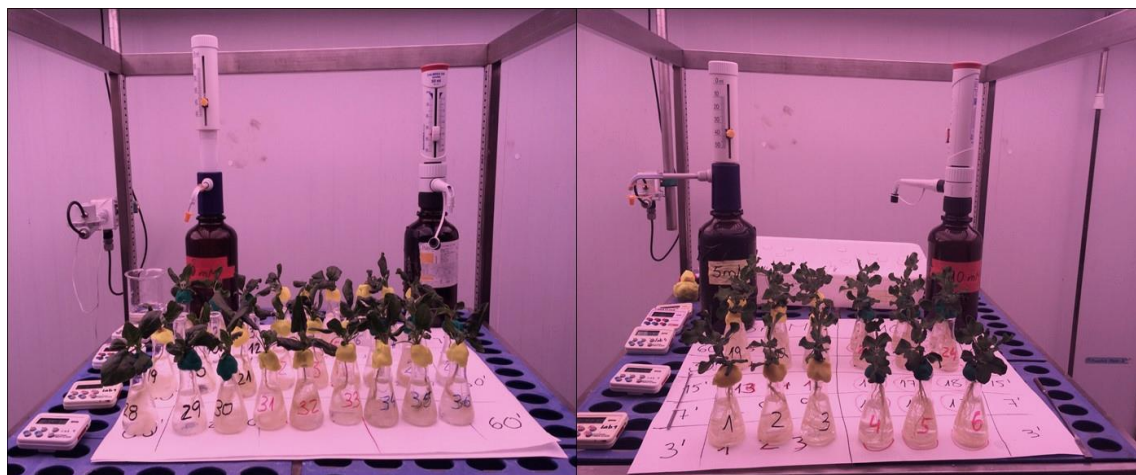


Imagen 1- Plantas de espinaca (*Spinacea oleracea* L., cv. Gigante de Invierno) y plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Sugar-snap) en el ensayo de la cinética de absorción con mezcla de nitrato y amonio, en el interior de la cámara de crecimiento.

4.3.8. Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm desviación estándar con un $n = 3-10$ mediciones independientes y fueron tratados mediante el programa SPSS Statistics versión 23.0 para Windows. Los resultados obtenidos se sometieron a un test de homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene después de comprobar la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) con los datos, y un análisis post hoc DUNCAN con un nivel de significación del 95%. El resultado de las pruebas post hoc se muestra en las tablas y en las figuras con letras que representan diferencias significativas entre los tratamientos.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Espinaca

El efecto de la aplicación de amonio y nitrato como única fuente de N y de distintas ratios de amonio y nitrato en plantas de espinaca crecidas durante 3 semanas en cultivo hidropónico presentó las mayores diferencias significativas en el crecimiento de las plantas cuando la fuente de N aplicada fue NO_3^- o NH_4^+ , siendo menores estas diferencias en el crecimiento para las nutriciones mixtas. El crecimiento presentó la misma tendencia para la parte aérea, raíz y consecuentemente para la biomasa total de la planta. La mayor y menor acumulación de biomasa se encontraron en presencia de 5 mM de NO_3^- y 5 mM NH_4^+ , respectivamente, siendo la acumulación de biomasa de las plantas crecidas con amonio un 68% más baja que la de las plantas crecidas con nitrato, indicando que la espinaca es una especie sensible al amonio. Las plantas cuando fueron crecidas con las ratios 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- ; 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- y 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- , presentaron en la acumulación de biomasa una respuesta intermedia entre el máximo valor obtenido con 5 mM de NO_3^- y el mínimo para 5mM de NH_4^+ (Figura 1).

La aplicación de amonio y nitrato como única fuente de N y de distintas ratios de amonio y nitrato en plantas de espinaca, crecidas en cultivo hidropónico, influyeron de forma significativa sobre el $\delta^{15}\text{N}$, tanto a nivel de hoja como de raíz (Figura 2). Se puede observar como al incrementar la concentración de amonio en la ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de la solución nutritiva, se produjo un descenso en el $\delta^{15}\text{N}$, tanto en las hojas como en la raíz, excepto para la ratio 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y el tratamiento de 5 mM de NH_4^+ en hojas, donde el valor se mantuvo constante. Independientemente de la ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, las plantas crecidas con NH_4^+ presentaron siempre valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ en sus tejidos, mientras que por el contrario el valor del $\delta^{15}\text{N}$ para las plantas crecidas solo con nitrato fue positivo.

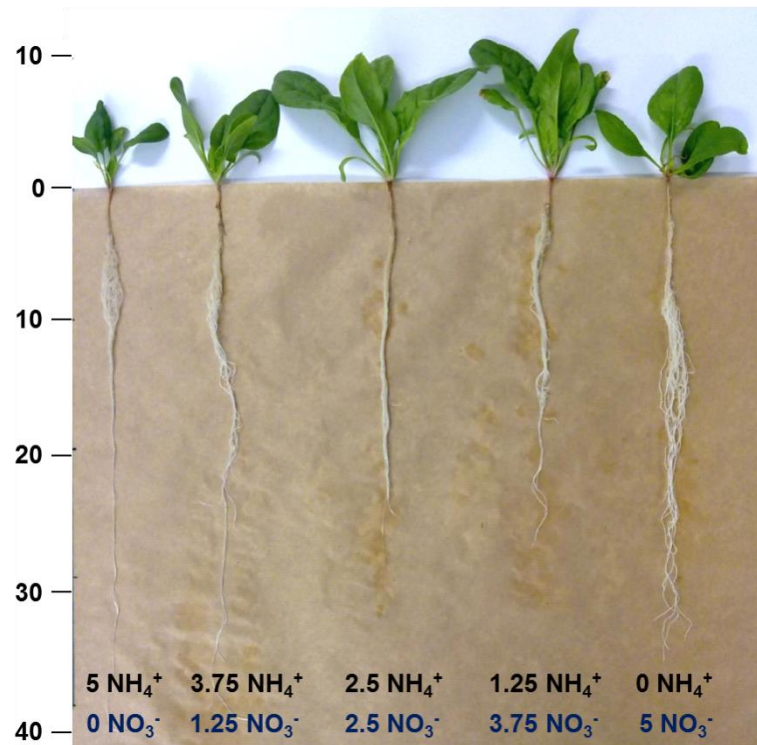


Imagen 2 – Aspecto de las plantas de espinaca tras la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintas ratios de amonio y nitrato crecidas durante 3 semanas en cultivo hidropónico. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ .

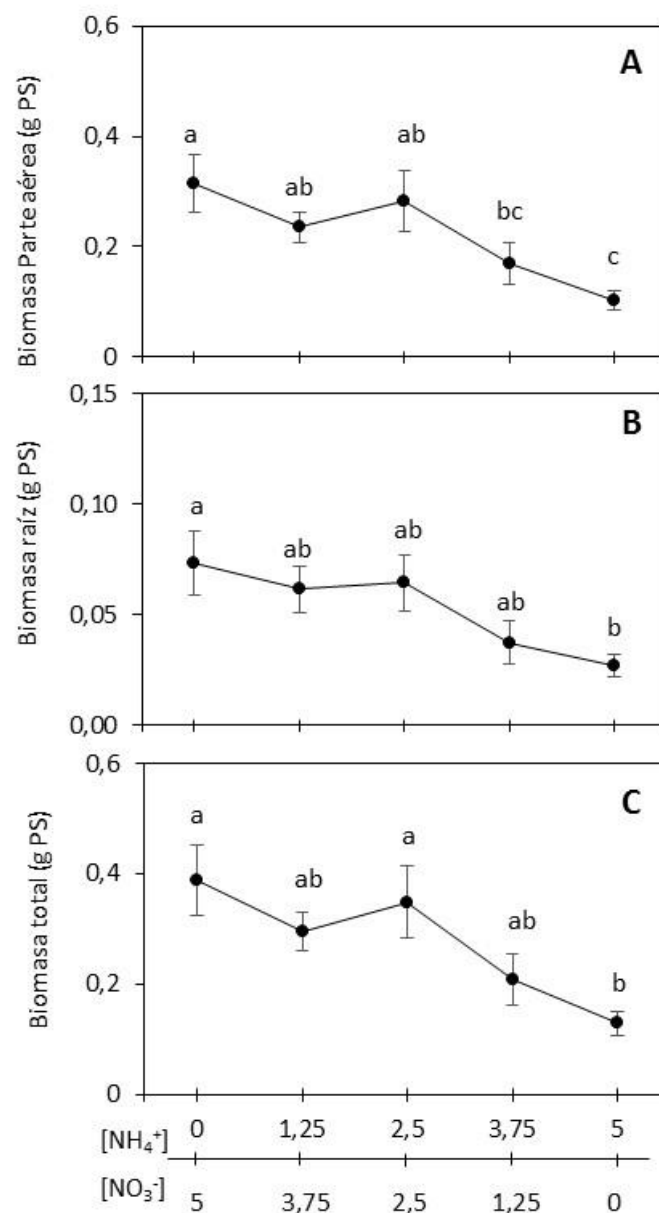


Figura 1: Producción de biomasa de parte aérea (A), raíz (B) y total (C) en plantas de espinaca crecidas con NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y distintos ratios de nitrato y amonio, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM de N. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar (n=8). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

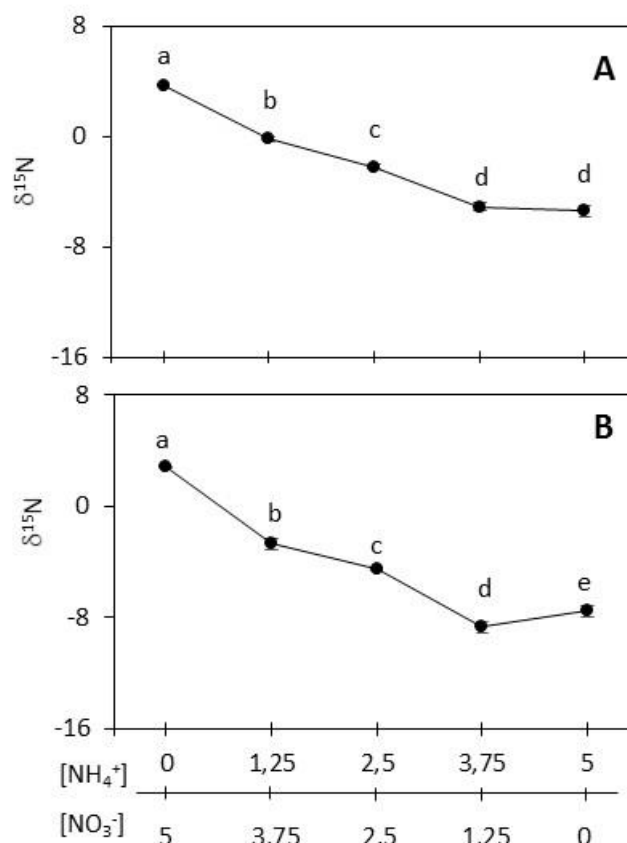


Figura 2: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el $\delta^{15}\text{N}$ en plantas de espinaca en hoja (A) y raíz (B), siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM de N para espinaca. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar (n=4). Las letras representan diferencias significativas (P \leq 0,05).

En la figura 3 se representan los porcentajes de C, N y la relación C/N de los tejidos de plantas de espinaca crecidas con NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y distintas ratios de NO_3^- y NH_4^+ . Es de resaltar que, en la parte aérea para el tratamiento de 5 mM de NH_4^+ , el porcentaje de C que presentan los tejidos de la planta fue significativamente más elevado respecto a los demás tratamientos. En la raíz el porcentaje de C se mantuvo constante al incrementarse los niveles de amonio en los tratamientos, presentando una disminución significativa para el tratamiento con nitrato como única fuente de N.

El porcentaje de N en hojas y raíces presentó diferencias significativas para los tratamientos aplicados, pero con un comportamiento diferencial entre órganos,

ya que mientras las hojas incrementaron su porcentaje en N a medida que se incrementaba el nivel de amonio de la solución nutritiva, en las raíces sin embargo, este porcentaje se vio significativamente disminuido a partir de la ratio $2,5 \text{ mM NH}_4^+/2,5 \text{ mM NO}_3^-$, alcanzando un valor mínimo para el tratamiento de solo amonio como fuente de N. La ratio C/N de los distintos órganos se vio afectada significativamente, tanto por las variaciones de los porcentajes de C como de N para los distintos tratamientos. Así podemos destacar que, en la parte aérea, el valor mínimo de la ratio C/N se obtuvo para el tratamiento de $2,5 \text{ mM NH}_4^+/2,5 \text{ mM NO}_3^-$, mientras que la raíz presentó un valor máximo de la ratio para el tratamiento de solo amonio.

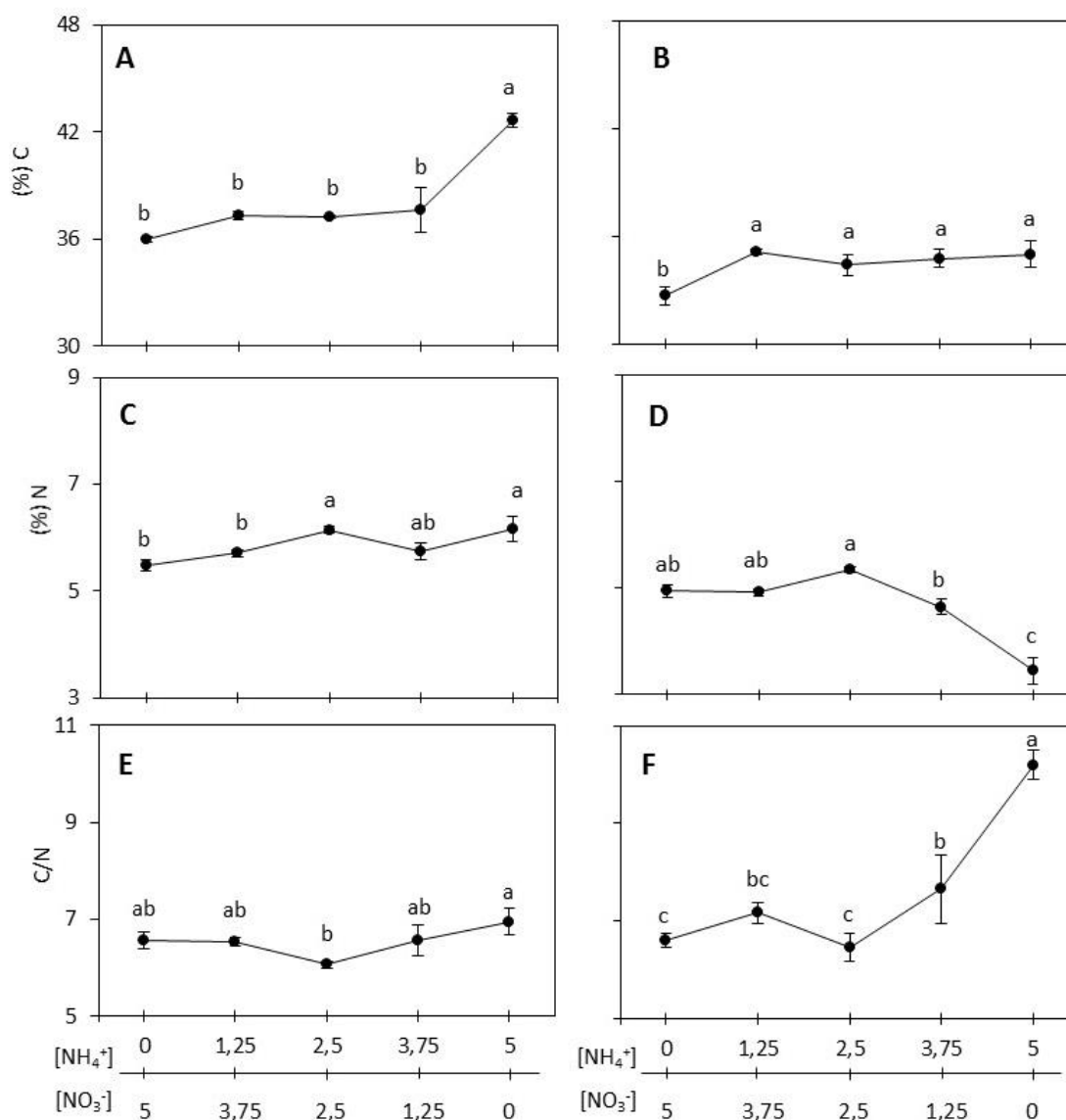


Figura 3: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el porcentaje de C en hojas (A), raíz (B), porcentaje de N en hojas (C) y raíz (D) y ratio C/N en hojas (E) y raíz (F) en plantas de espinaca, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Es de destacar que el valor significativamente más bajo de la NUE se obtuvo para el tratamiento 2,5 mM NH_4^+ / 2,5 mM NO_3^- , no siendo significativos los valores de la NUE para el resto de los tratamientos (Figura 4).

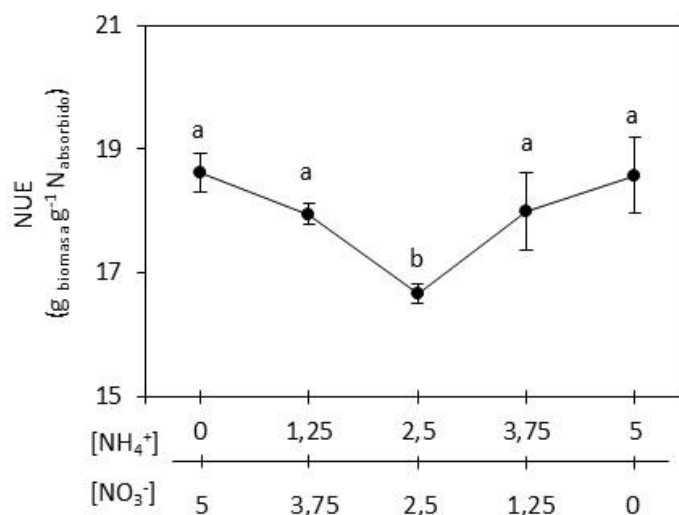


Figura 4: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre la eficiencia fisiológica en el Uso del Nitrógeno (NUE) en plantas de espinaca, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Las plantas crecidas con el tratamiento de solo amonio fueron las que mostraron un contenido de amonio significativamente más elevado tanto en la parte aérea como en la raíz, siendo la acumulación de este ion en los tejidos en ambos órganos aproximadamente entre 4 y 6 veces más elevada que en las plantas crecidas con el resto de los tratamientos. En las raíces, la acumulación de amonio fue también significativamente más elevada para los tratamientos de amonio 2,5 y 3,75 mM con respecto al tratamiento más bajo de amonio (1,25 mM) y al de solo nitrato (Figura 5 A y B).

La concentración de K^+ soluble en las plantas de espinaca fue más elevada en la parte aérea que en la raíz, observándose una disminución significativa de su contenido en la parte aérea a medida que la concentración de amonio aplicada

en la solución nutritiva iba incrementándose. Por el contrario, el efecto del incremento de la concentración de amonio sobre los contenidos de K^+ en la raíz, no presentaron una correlación tan significativa como en el caso de la parte aérea, ya que no se observaron diferencias entre los tratamientos con las concentraciones más elevadas de amonio aplicadas (Figura 5 C y D). La ratio K^+ / NH_4^+ presentó un comportamiento más uniforme, disminuyendo tanto en la parte aérea como en la raíz, a medida que la concentración de amonio en la solución nutritiva se iba incrementando (Figura 5 E y F).

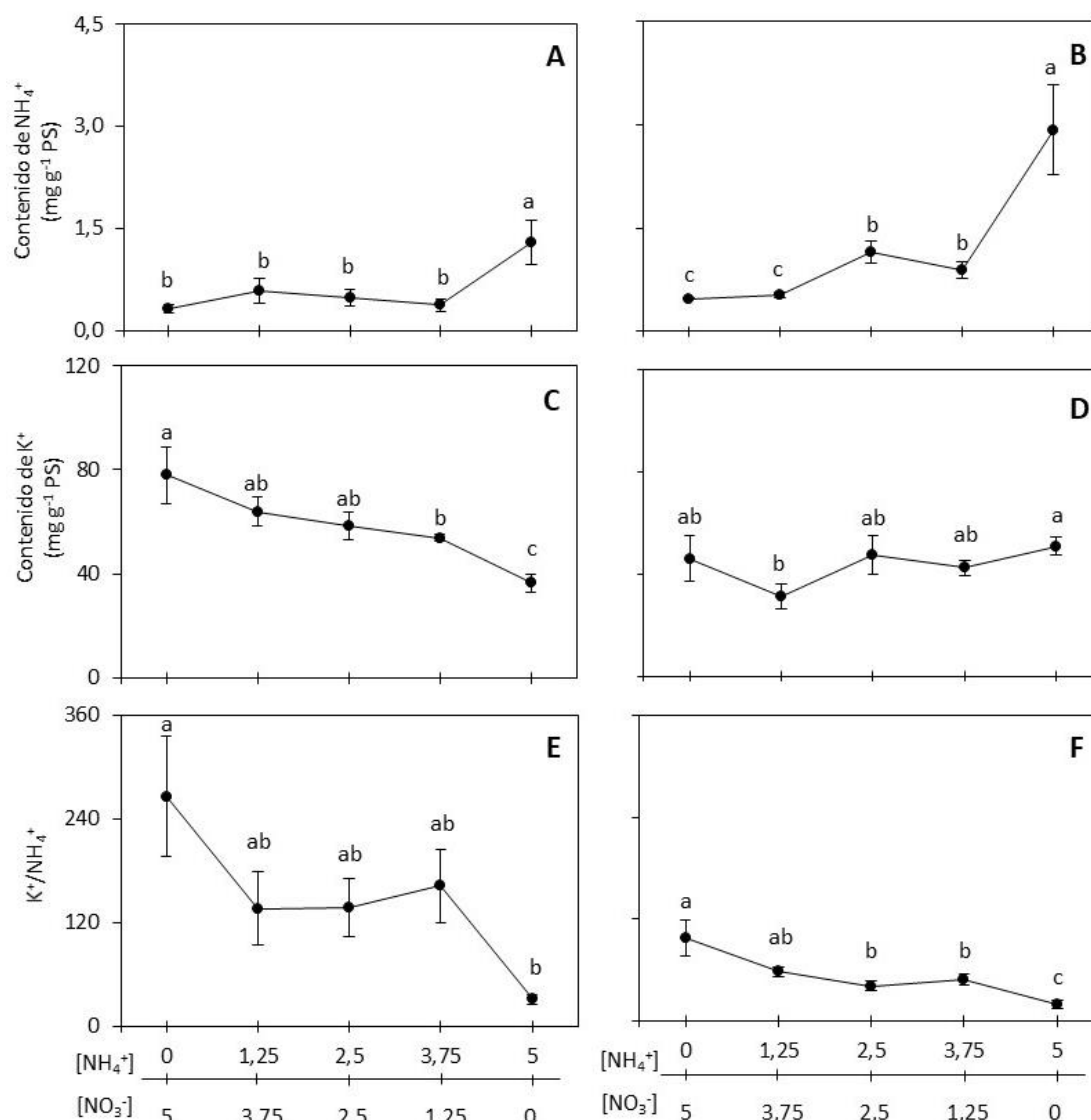


Figura 5: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el contenido de NH_4^+ en hojas (A), raíz (B), contenido de K^+ en hojas (C) y raíz (D) y ratio K^+/NH_4^+ en hojas (E) y raíz (F) en plantas de espinaca, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM $\text{NH}_4^+ / 3,75$ mM NO_3^- , 2,5 mM $\text{NH}_4^+ / 2,5$ mM NO_3^- , 3,75 mM $\text{NH}_4^+ / 1,25$ mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

El nitrato se acumuló en plantas de espinaca tanto en la raíz como en la parte aérea, estando su acumulación relacionada con la concentración del nitrato en la solución si bien esta correlación no se mantuvo de forma significativa para todas las concentraciones, en particular en hojas. En hojas el valor máximo del contenido de nitrato lo presentó de forma significativa el tratamiento de 3,75 mM de nitrato, mientras que en el resto de los tratamientos 5, 2,5 y 1,75 mM, no se observaron diferencias significativas entre ellos. En raíces, por el contrario, el valor máximo de contenido de nitrato lo presentó el tratamiento de 5 mM de nitrato, mientras que el resto de los tratamientos 3,75, 2,5 y 1,75 mM, no presentaron diferencias significativas entre los mismos. Es de resaltar que el nitrato se pudo determinar en todos tratamientos, incluso en el tratamiento de solo amonio como única fuente de N. Los valores detectados de este anión para este tratamiento fueron de 0,03 y 0,7 mg g⁻¹ PS en hoja y raíz, respectivamente. Se pudo comprobar que la solución nutritiva base inicial no contenía nitrato por tanto la detección, aunque baja de este ion podría ser un artefacto ya que estas concentraciones estaban próximas al límite de la sensibilidad de su determinación (Figura 6).

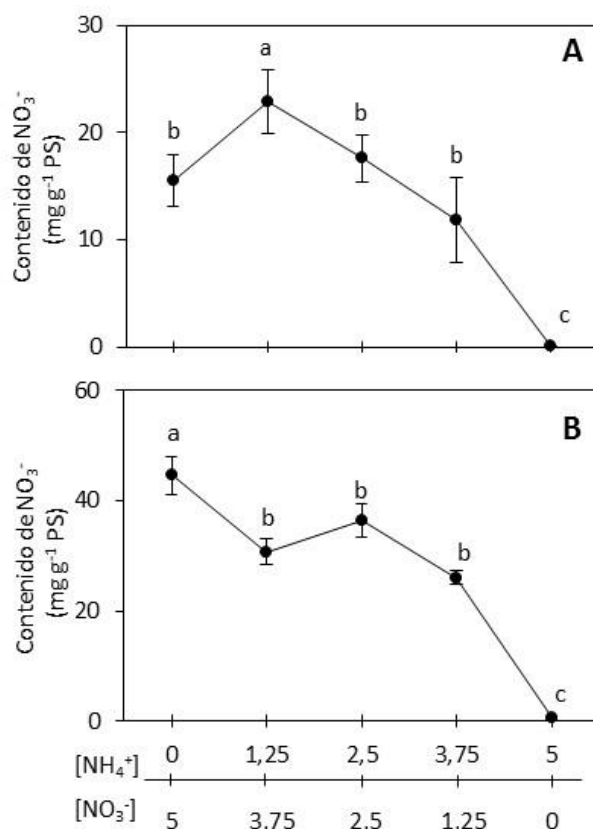


Figura 6: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el contenido de NO_3^- en hojas (A) y raíz (B) en plantas de espinaca, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Como se observa en la tabla 3, la aplicación de las distintas ratios de nitrato y amonio en las plantas de espinacas influye en el contenido, expresado en porcentaje sobre nitrógeno total, tanto del nitrógeno orgánico como del nitrógeno amoniacal y nítrico.

Observamos que el contenido de N tanto en la raíz como en la parte aérea se encuentra casi en su totalidad bajo la forma de N orgánico, incrementándose conforme aumentamos los niveles de amonio. El porcentaje de N- NH_4^+ en la parte aérea se mantuvo constante en las distintas ratios, excepto en presencia exclusivamente de amonio en que el porcentaje del N- NH_4^+ se incrementó hasta 3 veces más que en el resto de los tratamientos. En la raíz al incrementarse la

proporción de nitrato, el contenido de NH_4^+ disminuyó, siendo el porcentaje del N-NH_4^+ igual que en la parte aérea 3 veces superior en la nutrición amoniacal. El porcentaje de N-NO_3^- fue muy superior al porcentaje de N-NH_4^+ en las distintas ratios excepto, cuando la fuente del N fue únicamente amonio. Además, el porcentaje de N-NO_3^- se vio reducido en presencia de amonio.

Tabla 3: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintas ratios de nitrato y amonio sobre el porcentaje de N orgánico, porcentaje de N- NO_3^- y porcentaje de N- NH_4^+ en hojas y raíz de plantas de espinaca, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar (n= 3). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Espinaca		Parte aérea			Raíz		
$[\text{NH}_4^+]$	$[\text{NO}_3^-]$	%N _{orgánico}	%N- NH_4^+	%N- NO_3^-	%N _{orgánico}	%N- NH_4^+	%N- NO_3^-
0 mM	5 mM	93 \pm 0,2 bc	0,4 \pm 0,1 b	7,3 \pm 0,3 ab	79 \pm 1,6 c	0,7 \pm 0,0 c	20,3 \pm 1,6 a
1,25 mM	3,75 mM	90 \pm 1,4 c	0,8 \pm 0,2 b	9,1 \pm 1,2 a	85 \pm 1,0 b	0,8 \pm 0,1 c	14,1 \pm 1,1 b
2,5 mM	2,5 mM	93 \pm 1,0 bc	0,6 \pm 0,2 b	6,5 \pm 0,8 ab	83 \pm 1,2 b	1,7 \pm 0,2 b	15,3 \pm 1,3 b
3,75 mM	1,25 mM	95 \pm 1,7 b	0,5 \pm 0,1 b	4,6 \pm 1,5 b	86 \pm 0,8 b	1,5 \pm 0,2 b	12,6 \pm 0,6 b
5 mM	0 mM	98 \pm 0,4 a	1,6 \pm 0,4 a	0,01 \pm 0,0 c	93 \pm 1,6 a	6,6 \pm 1,5 a	0,4 \pm 0,2 c

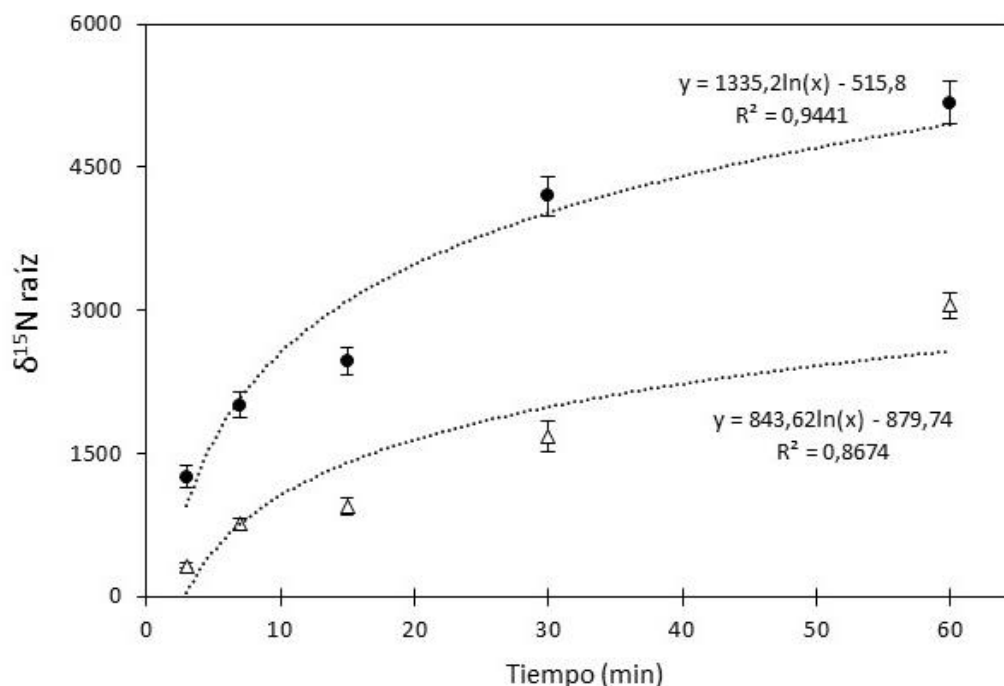


Figura 7: Cinética de absorción de nitrato (Δ) y amonio (●) por plantas de espinaca cuando se aportan simultáneamente en un ratio de 2,5 mM NO_3^- : 2,5 mM NH_4^+ , utilizando el marcaje $\delta^{15}\text{N}$ observado en las raíces. El asterisco de la leyenda representa la molécula enriquecida al 60% con ^{15}N . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=3$).

En el ensayo a corto plazo de la cinética de absorción de amonio y nitrato en las plantas de espinaca (Figura 7), el $\delta^{15}\text{N}$ se utilizó como herramienta para determinar la cantidad de ^{15}N que entra como una fuente u otra por las raíces de las plantas según nuestras condiciones experimentales. Se observó que el $\delta^{15}\text{N}$ aumentó a medida que pasaba el tiempo de ensayo y no encontramos una saturación de entrada ni del nitrato ni del amonio a tiempo de 60 minutos. Se puede observar claramente la preferencia y la mayor velocidad de la entrada de amonio en las plantas respecto a la entrada de nitrato ya que presenta valores de marcaje superiores y una pendiente de la curva de tendencia mayor cuando el amonio es marcado a cuando lo es el nitrato.

Por otra parte, el marcaje de la parte aérea de las plantas de espinaca a los 60 minutos fue $\delta^{15}\text{N}$ para amonio 122 ± 15 y $\delta^{15}\text{N}$ para nitrato 127 ± 13 .

4.4.2. Guisante

El efecto de la aplicación de amonio y nitrato como única fuente de N y de distintas ratios de amonio y nitrato en plantas de guisante crecidas durante 2 semanas en cultivo hidropónico presentó diferencias significativas en el crecimiento de las mismas, principalmente cuando la fuente de N aplicada fue exclusivamente NO_3^- o NH_4^+ y siendo menores estas diferencias en el crecimiento para las nutriciones mixtas.



Imagen 3 – Aspecto de las plantas de guisante tras la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de amonio y nitrato crecidas durante 2 semanas en cultivo hidropónico. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ .

A excepción del tratamiento de solo amonio como fuente de nitrógeno (10 mM de NH_4^+), en donde se observó una reducción del 44% de la biomasa acumulada, las plantas de guisante no presentaron diferencia significativa en su parte aérea para el resto de los tratamientos (Figura 8 A). En la raíz, sin embargo, los tratamientos con distintos ratios amonio y nitrato y solo amonio presentaron una

mayor biomasa respecto a las plantas crecidas únicamente con nitrato como única fuente de N (Figura 8 B). Por el contrario, la biomasa total de las plantas de guisante crecidas con 10 mM NH_4^+ se redujo significativamente respecto a las plantas crecidas con 10 mM de NO_3^- y las distintas ratios amonio/nitrato (Figura 8 C).

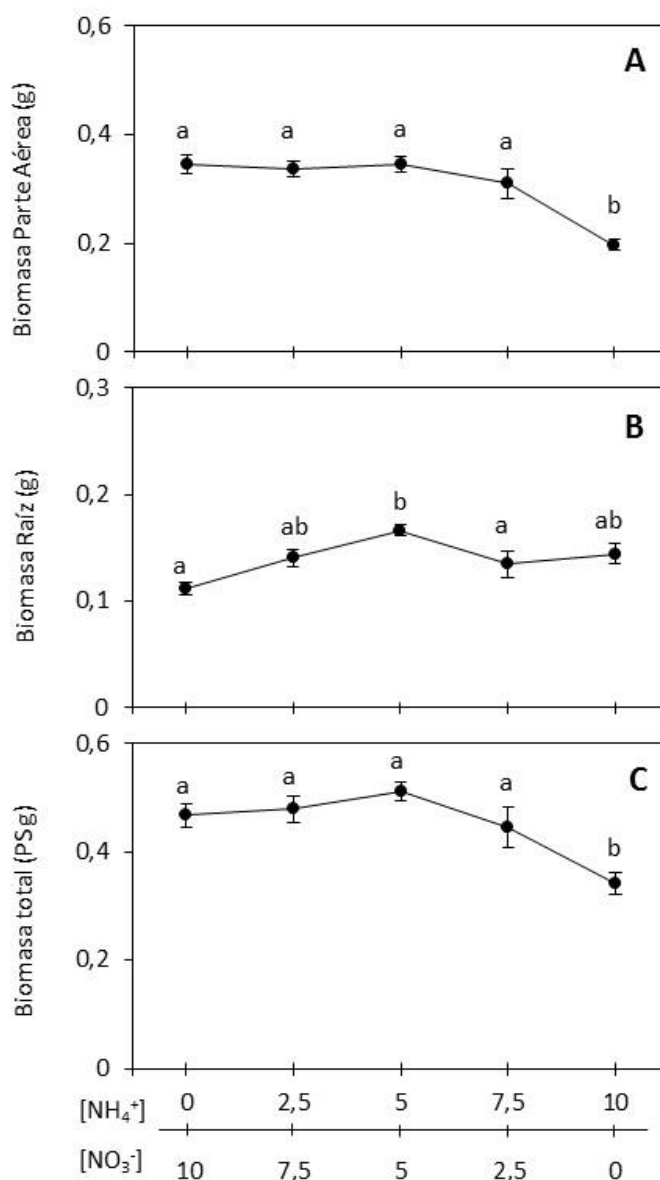


Figura 8: Producción de biomasa de parte aérea (A), raíz (B) y total (C) en plantas de guisante crecidas con NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y distintos ratios de nitrato y amonio, siendo la concentración final de todos los tratamientos 10 mM de N. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /7,5 mM NO_3^- , 5 mM NH_4^+ /5 mM NO_3^- , 7,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar (n=8). Las letras representan diferencias significativas (P ≤ 0,05).

La aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de amonio y nitrato en plantas de espinaca influyeron de forma significativa sobre el $\delta^{15}\text{N}$, tanto a nivel de hoja como de raíz (Figura 9 A y B). Se puede observar como al incrementar la concentración de amonio en la ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ de la solución nutritiva, se produjo un descenso en el $\delta^{15}\text{N}$, tanto en las hojas como en la raíz, siendo más acusado este descenso en el caso de la raíz. Independientemente de la ratio $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$, las plantas crecidas con NH_4^+ presentaron siempre valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ en sus tejidos, mientras que el valor del $\delta^{15}\text{N}$ de la parte aérea de las plantas de guisante crecidas solo con nitrato fue positivo.

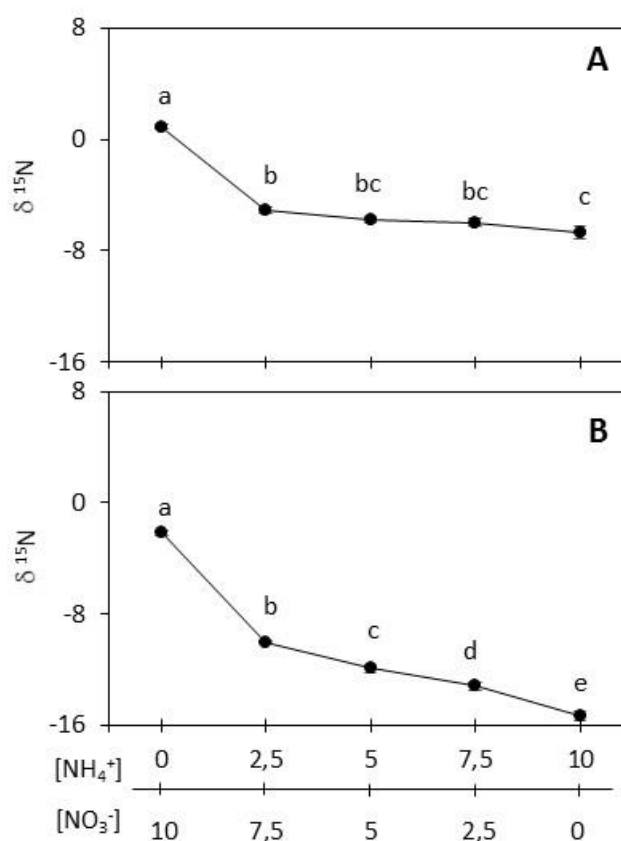


Figura 9: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el $\delta^{15}\text{N}$ en plantas de guisante en hoja (A) y raíz (B), siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM de N para espinaca. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM $\text{NH}_4^+/\text{7,5 mM NO}_3^-$, 5 mM $\text{NH}_4^+/\text{5 mM NO}_3^-$, 7,5 mM $\text{NH}_4^+/\text{2,5 mM NO}_3^-$ y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

De forma general, el porcentaje de C en los tejidos (raíz y parte aérea) de plantas de guisante crecidas con solo amonio y las distintas ratios amonio/nitrato fue más elevado que el presentado por las plantas crecidas con nitrato como única fuente de nitrógeno (Figura 10 A y B). El porcentaje de N total en los tejidos (raíz y parte aérea) presentó valores más bajos cuando las plantas crecieron con amonio o nitrato como única fuente de N que cuando estas crecieron con fuente mixta amonio/nitrato. En plantas crecidas con los distintos tratamientos de fuente mixta amonio/nitrato, el porcentaje de N fue más elevado y se mantuvo constante en la parte aérea; mientras que por el contrario en la raíz el tratamiento de 2,5 mM de NH_4^+ : 7,5 mM de NO_3^- fue significativamente menor que el de 5 mM de NH_4^+ : 5 mM de NO_3^- y 7,5 mM de NH_4^+ : 2,5 mM de NO_3^- respectivamente (Figura 10 C y D). La relación C/N de las plantas de guisante crecidas con amonio o nitrato como única fuente de N fue más elevada que las que presentaron las plantas crecidas con los tratamientos de fuente mixta amonio/nitrato (Figura 10 E y F).

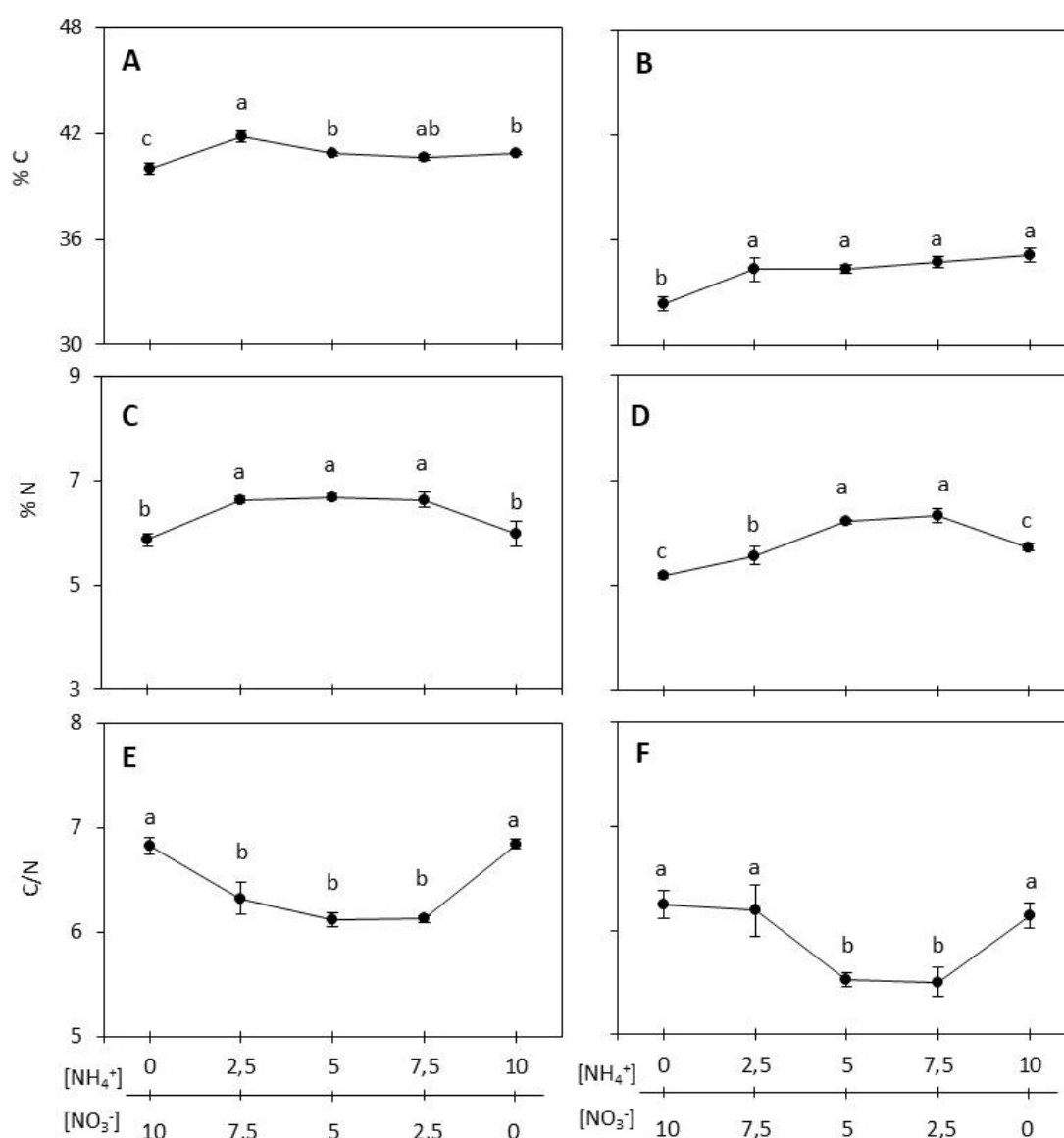


Figura 10: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre el porcentaje de C en hojas (A), raíz (B), porcentaje de N en hojas (C) y raíz (D) y ratio C/N en hojas (E) y raíz (F) en plantas de guisante, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /7,5 mM NO_3^- , 5 mM NH_4^+ /5 mM NO_3^- , 7,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Como consecuencia de que los tratamientos con amonio y nitrato como únicas fuentes de N presentaban un menor porcentaje de N_{total} en los tejidos (raíz y parte aérea), la eficiencia en el uso de N estimada como la cantidad de biomasa producida por la cantidad de N absorbido, fue significativamente más elevada para estos tratamientos que para los tratamientos de fuente mixta de amonio/nitrato (Figura 11).

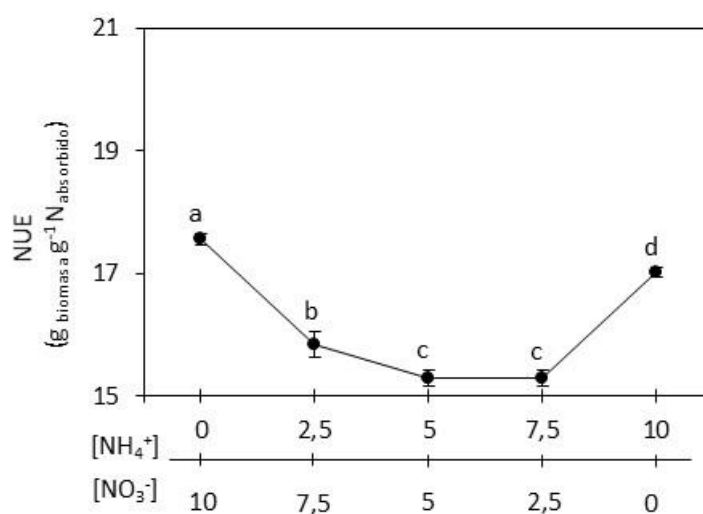


Figura 11: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintos ratios de nitrato y amonio sobre la eficiencia fisiológica en el Uso del Nitrógeno (NUE) en plantas de guisante, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /7,5 mM NO_3^- , 5 mM NH_4^+ /5 mM NO_3^- , 7,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Las plantas de guisante no presentaron en sus tejidos diferencias significativas en el contenido de NH_4^+ para los distintos tratamientos, siendo el contenido de NH_4^+ en la raíz 3 veces más elevado que en la parte aérea (Figura 12 A y B). Similares resultados pueden ser observados con relación a la concentración de K^+ en las plantas de guisante, ya que en la raíz fue más elevada que en la parte aérea (Figura 12 C y D). En la parte aérea el contenido de K^+ no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados, mientras que en la raíz los tratamientos de 5 mM de NH_4^+ :5 mM de NO_3^- y 10 mM de NH_4^+

presentaron valores significativamente menores respecto a la dosis 2,5 mM de NH_4^+ :7,5 mM de NO_3^- . La ratio K^+/NH_4^+ en la parte aérea y raíz en presencia de altas dosis de amonio disminuyó significativamente respecto al presentado por las plantas crecidas con nitrato como única fuente de N (Figura 12 E y F).

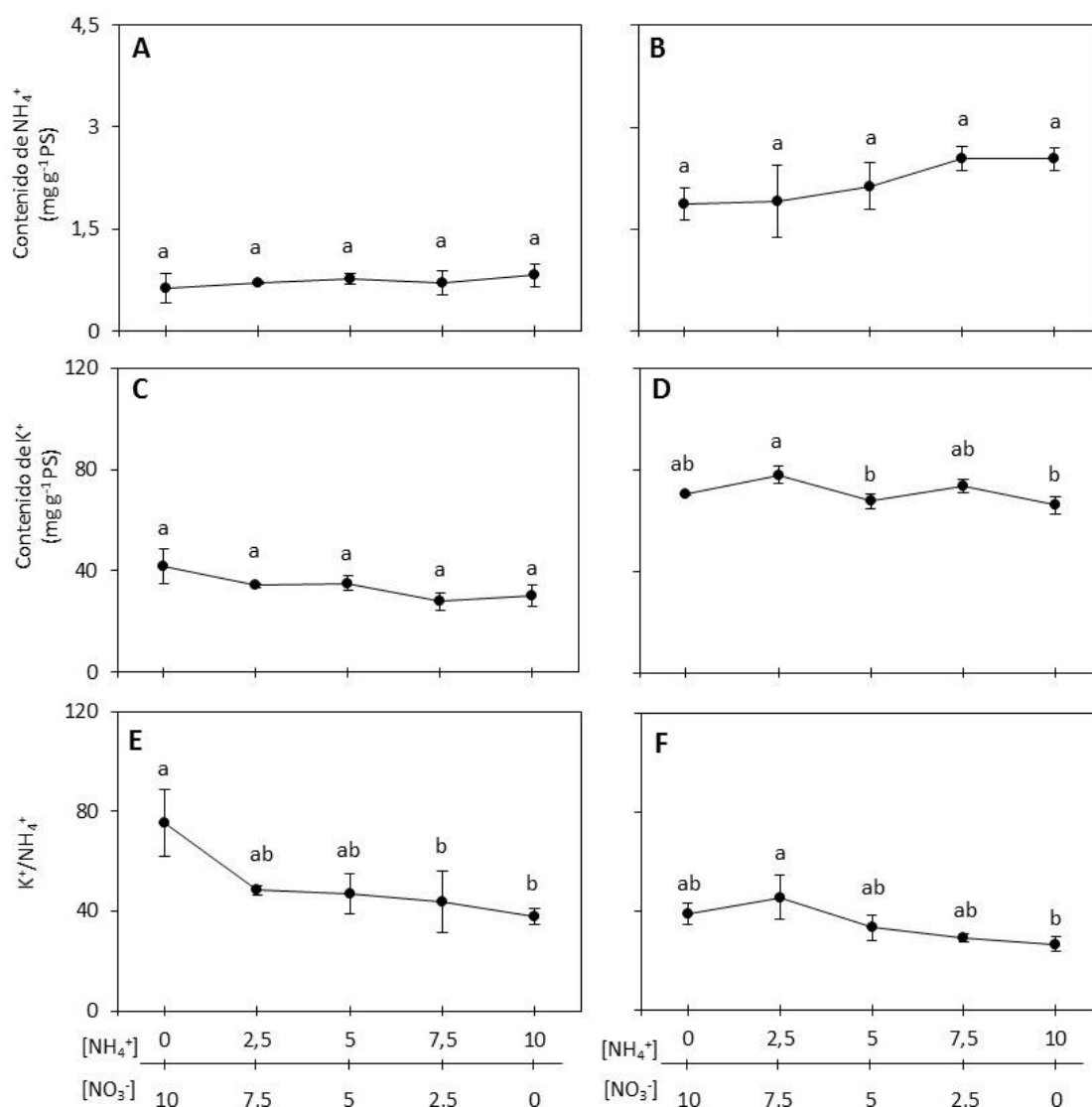


Figura 12: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintas ratios de nitrato y amonio sobre el contenido de NH_4^+ en hojas (A), raíz (B), contenido de K^+ en hojas (C) y raíz (D) y ratio K^+/NH_4^+ en hojas (E) y raíz (F) en plantas de guisante, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM $\text{NH}_4^+/\text{7,5 mM NO}_3^-$, 5 mM $\text{NH}_4^+/\text{5 mM NO}_3^-$, 7,5 mM $\text{NH}_4^+/\text{2,5 mM NO}_3^-$ y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

El nitrato se acumuló en plantas de guisante tanto en la raíz como en la parte aérea, estando su acumulación relacionada con la concentración del nitrato en la solución, esta correlación se mantuvo de forma significativa para todas las concentraciones. Es de resaltar que el NO_3^- se pudo determinar en todos tratamientos, incluso en el tratamiento de solo NH_4^+ como única fuente de N igual que lo observado en espinaca. Los valores detectados de este anión para este tratamiento fueron de 0,05 y 0,06 mg g^{-1} PS en hoja y raíz, respectivamente (Figura 13).

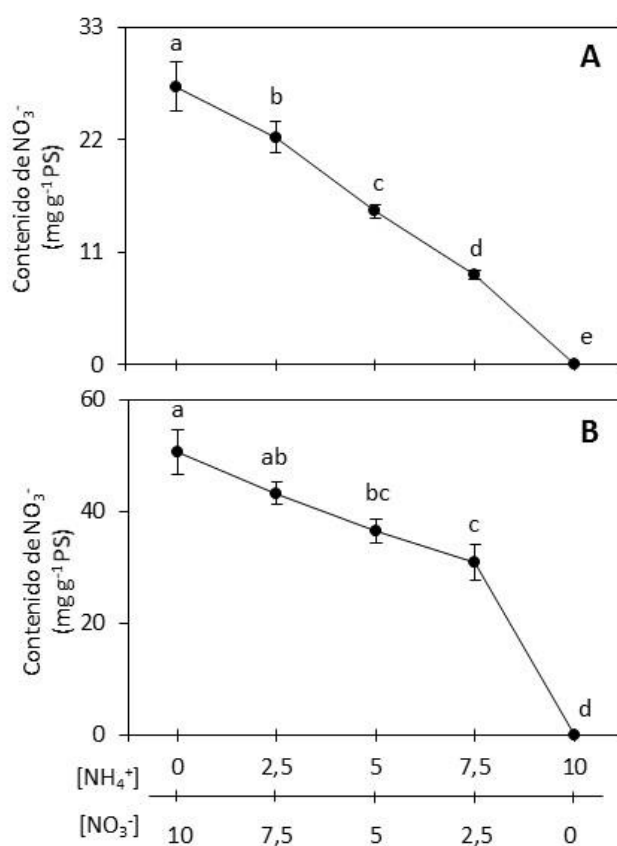


Figura 13: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintas ratios de nitrato y amonio sobre el contenido de NO_3^- en hojas (A) y raíz (B) en plantas de guisante, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 10 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /7,5 mM NO_3^- , 5 mM NH_4^+ /5 mM NO_3^- , 7,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- y 10 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=4$). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

En la tabla 4, observamos como la aplicación de las distintas ratios de nitrato y amonio afectan al porcentaje de nitrógeno orgánico, amoniacal y nítrico en las plantas de guisante, tanto en la parte aérea como en la raíz.

El N orgánico representa, como mínimo, más del 75% del contenido de N total de las plantas de guisante. Tanto la parte aérea como la raíz presentaron la misma tendencia, incrementándose significativamente el contenido de N orgánico al aumentar la concentración de amonio de la solución nutritiva. El porcentaje de N-NH_4^+ no presentó diferencias significativas y se mantuvo constante en todos los tratamientos en ambos órganos, incluso cuando la fuente de N fue únicamente amonio. Al contrario del porcentaje de N-NH_4^+ , el porcentaje de N-NO_3^- aumentó a medida que aumentamos la dosis de nitrato en las distintas ratios, siendo el porcentaje de N-NO_3^- en la raíz alrededor de dos veces más elevado que en la parte aérea. El porcentaje de N-NO_3^- en los tejidos de las plantas de guisante fue significativamente mayor que el porcentaje de N-NH_4^+ en los distintos tratamientos a excepción de cuando la fuente aportada fue exclusivamente con amonio.

Tabla 4: Efecto de la aplicación de NH_4^+ y NO_3^- como única fuente de N y de distintas ratios de nitrato y amonio sobre el porcentaje de N orgánico, porcentaje de N- NO_3^- y porcentaje de N- NH_4^+ en hojas y raíz de plantas de guisante, siendo la concentración final de todos los tratamientos 5 mM. Los tratamientos aplicados son: 5 mM NO_3^- , 1,25 mM NH_4^+ /3,75 mM NO_3^- , 2,5 mM NH_4^+ /2,5 mM NO_3^- , 3,75 mM NH_4^+ /1,25 mM NO_3^- y 5 mM de NH_4^+ . Los valores representan el promedio \pm error estándar (n= 3). Las letras representan diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Guisante		Parte aérea			Raíz		
$[\text{NH}_4^+]$	$[\text{NO}_3^-]$	% N _{orgánico}	% N- NH_4^+	% N- NO_3^-	% N _{orgánico}	% N- NH_4^+	% N- NO_3^-
0 mM	10 mM	89 \pm 0,9 e	0,8 \pm 0,3 a	11,2 \pm 1,0 a	75 \pm 1,8 d	2,8 \pm 0,4 a	23,1 \pm 1,8 a
2,5 mM	7,5 mM	92 \pm 0,5 d	0,8 \pm 0,0 a	8,8 \pm 0,6 ab	80 \pm 0,3 c	2,7 \pm 0,7 a	19,8 \pm 0,9 a
5 mM	5 mM	94 \pm 0,3 c	0,9 \pm 0,1 a	5,5 \pm 0,2 bc	84 \pm 1,0 b	2,7 \pm 0,4 a	15,4 \pm 0,9 b
7,5 mM	2,5 mM	96 \pm 0,3 b	0,8 \pm 0,2 a	3,4 \pm 0,2 c	86 \pm 1,2 b	3,1 \pm 0,2 a	14,9 \pm 1,5 b
10 mM	0 mM	99 \pm 0,2 a	1,1 \pm 0,2 a	0,02 \pm 0,0 d	97 \pm 0,2 a	3,4 \pm 0,2 a	0,0 \pm 0,0 c

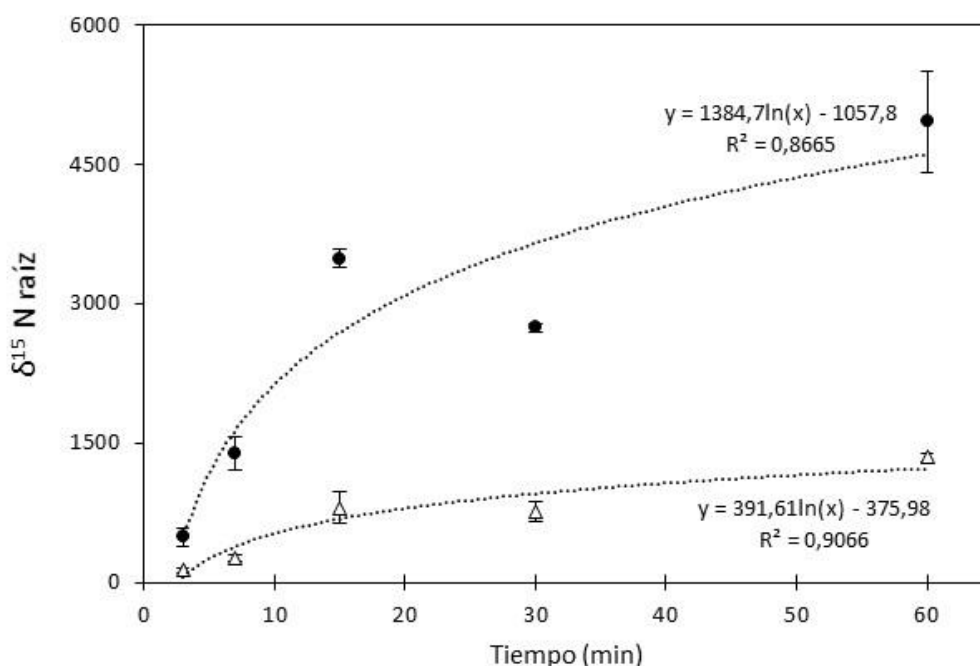


Figura 14: Cinética de absorción de nitrato (Δ) y amonio (●) por plantas de guisante cuando se aportan simultáneamente en un ratio de 5 mM NO_3^- : 5 mM NH_4^+ , utilizando el marcaje $\delta^{15}\text{N}$ observado en las raíces. El asterisco de la leyenda representa la molécula enriquecida al 60% con ^{15}N . Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=3$).

En el ensayo a corto plazo de la cinética de absorción de amonio y nitrato en las plantas de guisante (Figura 14). Se observó que el $\delta^{15}\text{N}$ aumentó a medida que pasaba el tiempo de ensayo y no encontramos una saturación de entrada amonio ni de nitrato a tiempo de 60 minutos. Se puede observar claramente la preferencia y la mayor velocidad de la entrada de amonio en las plantas respecto a la entrada de nitrato ya que presenta valores de marcaje superiores y una pendiente de la curva de tendencia mayor cuando el amonio es marcado a cuando lo es el nitrato.

Por otra parte, el marcaje de la parte aérea de las plantas de espinaca a los 60 minutos fue $\delta^{15}\text{N}$ para amonio $7,4 \pm 3,8$ y $\delta^{15}\text{N}$ para nitrato $79,5 \pm 21,7$.

4.5. DISCUSIÓN

Las plantas son capaces de utilizar las diversas formas de N mineral que están presentes en los suelos, fundamentalmente nitrato y amonio, ya que los niveles de nitrito en los suelos en condiciones normales son prácticamente indetectables; asimismo son capaces de utilizar fuentes nitrogenadas de carácter orgánico como aminoácidos, péptidos, etc (Chapin, 1995).

Distintos estudios han puesto de manifiesto que la respuesta fisiológica y metabólica de las plantas puede verse afectada por la fuente de N utilizada para su crecimiento (Lasa et al., 2001, Britto y Kronzucker, 2002). Es conocido que las mezclas de nitrato y amonio en las soluciones nutritivas, en comparación con cualquiera de las fuentes de N aplicadas independientemente, son beneficiosas y estimulan el crecimiento de las plantas (Britto y Kronzucker, 2002). Recientemente en la revisión realizada por Hachiya y Sakakibara (2017), estos autores ponen de manifiesto, que la nutrición mixta de nitrato y amonio resulta ser beneficiosa, en términos de crecimiento de la planta, cuando se compara con nitrato o amonio como única fuente de nitrógeno. Nuestros resultados muestran que la nutrición mixta proporciona mejores resultados que la nutrición amoniacal pero no que la nítrica. Se observa un efecto beneficioso del aporte de nitrato que revierte la respuesta negativa de las plantas frente al amonio de forma más patente en las plantas de espinaca que en las de guisante.

El nitrato es normalmente la fuente de N preferida por la mayoría de las plantas, especialmente las cultivadas, aunque la absorción y asimilación del ion NO_3^- sea metabólicamente más costosa que la absorción y asimilación del amonio (Bloom et al., 1992). El amonio una vez absorbido es rápidamente metabolizado en compuestos orgánicos nitrogenados. Sin embargo, si la planta es sensible al amonio, esta muestra signos de toxicidad, traducidos en una disminución del crecimiento, si bien los síntomas de toxicidad difieren ampliamente entre las especies de plantas.

La sensibilidad de las plantas de espinaca y la tolerancia de las plantas de guisante frente a la nutrición amoniacal ya fueron estudiadas con anterioridad, observándose que el guisante era tolerante y la espinaca sensible (Lasa et al., 2001; Domínguez-Valdivia et al., 2006; Ariz et al., 2011). En el presente estudio observamos que la nutrición exclusivamente nítrica resultó ser más efectiva que

la nutrición exclusivamente amoniacal en el crecimiento de plantas tanto de espinaca como de guisante (Figuras 1 C y 8 C). Las plantas de espinaca son muy sensibles a la nutrición amoniacal ya que en presencia de solo amonio redujeron su crecimiento un 68% y un 71% en la parte aérea y la raíz respectivamente con respecto al crecimiento con nitrato. Por el contrario, el guisante, especie que es considerada tolerante a la nutrición amoniacal cuando creció exclusivamente con amonio como única fuente de N redujo su crecimiento solo en un 44% en la parte aérea, no viéndose afectado el crecimiento de la raíz. El guisante presenta diferencias en la sensibilidad a la nutrición amoniacal dependiendo de las diferentes variedades utilizadas en los estudios (Domínguez-Valdivia et al., 2008). Las plantas de guisante, a diferencia de las de espinaca, mantuvieron con amonio como única fuente de N un crecimiento de la raíz más elevado que cuando estas crecían con nitrato; sin embargo al considerar la biomasa total de la planta, esta era más elevada en presencia de nitrato, lo que implicaría una redistribución de esqueletos carbonados diferente entre la raíz y la parte aérea que parece estar controlada por el tipo de fuente nitrogenada utilizada por las plantas (Domínguez-Valdivia et al., 2008).

Aunque la nutrición exclusivamente amoniacal presente toxicidad en muchas especies, esta puede ser reducida mediante el aporte de NO_3^- al medio, obteniéndose en la mayoría de los casos una respuesta significativa en el crecimiento de las plantas. Esta mejora en el crecimiento puede superar entre un 40% y un 70% las tasas de crecimiento máximo obtenidas con fuentes únicas de N (amonio o nitrato) en cultivos hidropónicos (Britto y Kronzucker, 2002). Asimismo, Helali et al. (2010) observaron en *Arabidopsis thaliana*, planta sensible a la nutrición amoniacal, que esta parecía poco sensible a la presencia de NH_4^+ en el medio cuando se suministraba NO_3^- simultáneamente a las plantas en concentración igual o similar a la de NH_4^+ . No obstante, hemos observado que la presencia conjunta de ambas fuentes nitrogenadas (amonio y nitrato) resultó ser diferente en el caso de las plantas de espinaca y de las de guisante, ya que mientras en guisante la presencia creciente de amonio en la solución nutritiva de crecimiento no tuvo efectos negativos ni sobre el crecimiento de la raíz ni de la parte aérea, en las plantas de espinaca se puede establecer de forma general que la presencia creciente de amonio afectó de forma significativa

(aunque no para todos los tratamientos aplicados) al crecimiento de la raíz y en mayor medida a la parte aérea, siendo el nitrato incapaz de revertir los efectos negativos del amonio sobre este.

Varios autores han relacionado esta inhibición del crecimiento por la nutrición amoniacal, con la bajada del pH del medio (Dijk y Grootjans, 1998; Ariz et al., 2011), dado que está comprobado que la nutrición amoniacal acidifica el medio radical (Marschner, 2012), pero en nuestro estudio, el efecto negativo de la presencia de amonio, no parece estar relacionado con este factor ya que el pH se controló durante todo el periodo de crecimiento de las plantas. Por otra parte, hay trabajos que postulan que la reducción del crecimiento de plantas crecidas con NH_4^+ podría ser causada por la falta de NO_3^- como anión osmótico importante para la expansión de células foliares, como es el caso de las plantas de espinacas (Raab y Terry, 1994), y/o por una reducción en la síntesis de ácidos orgánicos que proporcionan la carga aniónica para acompañar acumulación de cationes (Salsac et al., 1987).

Las enzimas, los transportadores y la fuente de N, relacionadas con el metabolismo de N, influyen en la composición isotópica de ^{15}N en los tejidos vegetales (Werner y Schimdt, 2002). En este sentido tal como Ariz et al. (2011) plantearon, la fuente de N que utilizan las plantas para su crecimiento es capaz de dotar a las mismas de una firma específica relacionada con la abundancia del isótopo ^{15}N . Estos autores proponen que los valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ observados en plantas crecidas con NH_4^+ como única fuente de N, se originan a partir de la absorción del NH_4^+ en forma NH_3 por la raíz de la planta. Además, esta disminución del isótopo de N más pesado es proporcional a la toxicidad por $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ en las distintas especies de plantas (Ariz et al., 2011). Los resultados obtenidos para las plantas de espinacas crecidas con nitrato como única fuente de N muestran valores al igual que otros autores de $\delta^{15}\text{N}$ positivos (Domínguez-Valdivia et al., 2008; Ariz et al., 2011), mientras que estos valores de enriquecimiento no fueron tan acusados en guisante, de hecho, incluso presentaron valores negativos en raíces; si bien hay que tener en consideración que la concentración de nitrato utilizada no fue la misma en ambos casos. Los valores positivos de $\delta^{15}\text{N}$ para las plantas crecidas con nitrato pueden asociarse con la pérdida de N por la planta, a través de exudados de la raíz o por la pérdida

de NH_3 a través de los estomas, lo que favorece al isótopo más ligero entre otros procesos (Evans y Poorter, 2001; Yoneyama et al., 2001; Kolb y Evans, 2003). Los valores negativos encontrados para el $\delta^{15}\text{N}$ en las plantas cuando crecen con distintos ratios de amonio/nitrato, pueden estar relacionados con las propiedades químicas del ion NH_4^+ en solución y los mecanismos de absorción $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ (Ariz et al., 2011). Cuando se aplica NH_4^+ conjuntamente con nitrato, aparte del ion nitrato, ambas formas NH_4^+ y NH_3 están presentes en la solución siendo todas ellas susceptibles de ser absorbidas por los distintos sistemas de transporte de nitrato (NRTs) y de amonio (AMTs) presentes en las membranas de las células radicales de las plantas. Varios autores han descrito el efecto que puede tener la presencia de una fuente de N (amonio o nitrato) sobre la absorción de la otra, así Liu et al. (2015) observaron que la presencia de amonio reducía la absorción de nitrato a pesar de que cada ion tiene su propio transportador específico, debiendo estar este efecto regulado a nivel genético. No obstante, se puede observar en nuestros resultados que, tanto para espinaca como para guisante, a medida que la concentración de amonio en la solución nutritiva se iba incrementando, los valores del $\delta^{15}\text{N}$ se iban haciendo cada vez más negativos. Este resultado estaría de acuerdo con la hipótesis propuesta por Ariz et al. (2011) de que un sistema de transporte de baja afinidad para NH_4^+ podría tener dos componentes: uno que transporta N en la forma iónica (NH_4^+) y no está asociado con el fraccionamiento y otro que transporta N en la forma molecular (NH_3) y está asociado con el fraccionamiento y sería el responsable de los valores negativos de ^{15}N en los tejidos de las plantas.

El porcentaje de C en la parte aérea de plantas de espinaca se mantuvo sin variaciones significativas para los tratamientos con nitrato y de nutrición mixta, incrementándose significativamente en espinaca, pero no en guisante para el tratamiento con solo amonio. En raíces, tanto de espinaca como de guisante, el porcentaje de C fue significativamente más bajo para el tratamiento con nitrato. En cuanto al porcentaje de N en los tejidos, es de destacar la reducción en el mismo que se observa en las plantas de espinaca, en particular para el tratamiento de amonio; en guisante esa reducción no fue tan acusada, siendo de destacar que los tratamientos con nutrición mixta en guisante fueron los que presentaron mayores porcentajes de N tanto en la parte aérea como en la raíz.

Si el porcentaje de N se descompone en $N_{\text{orgánico}}$ y N_{mineral} (amonio y nitrato), se puede observar que el porcentaje en forma de NO_3^- que presentan los tejidos de ambas especies, aunque no son comparables, ya que en el caso del guisante la concentración de nitrato de la solución nutritiva era el doble de la de espinaca, si nos indica que los tejidos pueden acumular cantidades importantes del mismo. Es interesante resaltar que se observa una reducción del porcentaje de N-NO_3^- en los tejidos a medida que se va reduciendo la concentración del nitrato en la solución nutritiva, indicando que bien la mayor presencia de amonio reduce la absorción de la forma nítrica como señalan Kronzucker et al. (1999b), o este efecto depende directamente de la concentración de nitrato de la solución. Asimismo, destacar la diferencia en esa reducción, especialmente en la parte aérea de ambas especies, donde en espinaca el efecto de la concentración de nitrato en la solución nutritiva no se traduce, a pesar de ser un 50% de la de guisante, en una reducción del porcentaje de nitrato tan acusada como en guisante, pudiendo esta respuesta estar relacionada con la mayor capacidad de la espinaca de acumular nitrato en la parte aérea en relación con aspectos osmóticos (Raab y Terry, 1994).

El porcentaje de N-NH_4^+ en los tejidos es muy inferior al que presenta la forma N-NO_3 , además estos porcentajes son muy estables especialmente en las plantas tolerantes a la nutrición amoniacal como es el caso del guisante, lo que indica la importancia del control de los niveles de amonio en las células para la tolerancia al mismo. Por el contrario, en el caso de espinaca, especie muy sensible a la nutrición amoniacal, los porcentajes de la forma N-NH_4^+ fueron significativamente más elevados con el tratamiento de solo amonio, especialmente en el tejido radicular, presentando para este tratamiento una reducción muy significativa del crecimiento.

El cálculo de la eficiencia en el uso del N (NUE) por la planta se ha estimado como los gramos de biomasa formados por gramos de N absorbido, es decir la capacidad de la planta de convertir el N absorbido en biomasa. Para la obtención de una eficiencia máxima el objetivo es minimizar el uso de recursos, en este caso la cantidad de N aportado es la misma en todos los tratamientos, lo que representa este cálculo es la eficiencia de la ratio de las distintas fuentes. La NUE cuando las fuentes aportadas son nitrato o amonio exclusivamente es de

valor similar (18 g biomasa g⁻¹ N absorbido para espinaca y 17 g biomasa g⁻¹ N absorbido para guisante) mostrando los valores máximos de eficiencia. Pero si analizamos este resultado vemos que la NUE es similar porque con nitrato tenemos alta biomasa y alta absorción de N, mientras que con amonio tenemos menor biomasa y menor absorción de N. Por otra parte, la menor NUE observada para ambas especies es la del tratamiento con fuente mixta al 50% porque tiene una biomasa similar a las plantas crecidas con nitrato, pero una mayor absorción de N. Estos resultados pueden ser debidos a que los flujos de la membrana plasmática para NH₄⁺, la acumulación de NH₄⁺ citosólico y el metabolismo de NH₄⁺ aumentan por la presencia de NO₃⁻, mientras que los flujos de NO₃⁻, la acumulación y el metabolismo del mismo son fuertemente reprimidos por NH₄⁺. Sin embargo, la adquisición neta de N y la translocación de N a la parte aérea bajo los tratamientos de nutrición mixta (amonio y nitrato) son significativamente más elevados, que cuando el NO₃⁻ o el NH₄⁺ se proporcionan solos a concentraciones idénticas de N (Kronzucker et al., 1999a).

La fuente de nitrógeno utilizada para el crecimiento de las plantas puede ejercer una considerable influencia en la composición mineral de las mismas (Leidi et al., 1991). Se ha considerado al NH₄⁺ como la forma principal de nitrógeno inorgánico reducido (N) que se transporta a través de las membranas biológicas. Esta hipótesis está respaldada por la relación entre la captación de NH₄⁺ y la homeostasis del pH (Weiner y Verlander, 2011) y por la competencia entre NH₄⁺ y K⁺ para el transporte a través de canales de cationes no selectivos (NSCC), que se vuelve significativa a altas concentraciones de amonio (Szczerba et al., 2008). En el presente trabajo, hemos observado que las plantas de guisante a diferencia de las plantas de espinaca no presentaron diferencias significativas en la concentración de K⁺ en la parte aérea para ninguno de los tratamientos, sin embargo, en las plantas de espinaca el contenido de K⁺ se vio significativamente reducido, especialmente para el tratamiento de amonio. En diferentes trabajos, donde se ha estudiado la influencia del NH₄⁺ sobre la absorción de K⁺, se ha demostrado que el NH₄⁺ tiene un efecto inhibitor sobre la absorción de K⁺, y esta inhibición probablemente sea responsable de la limitación del crecimiento de las plantas crecidas en medio amoniaco, como ha sido observada en tomate (Siddiqi et al., 2002), y *Arabidopsis* (Kronzucker et al., 2003; Helali et al., 2010).

Por otra parte, Kronzucker et al. (2003), propusieron que además de sus efectos sobre la asimilación de N y el equilibrio de cargas, el NH_4^+ induce en algunas especies una perturbación importante en los flujos de cationes y la homeostasis de los mismos a nivel radicular.

Han sido varios los autores que han observado que el nitrato es capaz de acumularse a elevadas concentraciones en los tejidos de la parte aérea y de las raíces de las plantas cuando estas son incapaces de asimilar todo el nitrato absorbido (Peuke y Jeschke, 1993). En nuestro estudio se pudo observar como el nitrato se acumuló significativamente en los distintos órganos de la planta, llegando a representar más del 20% del N de estos tejidos. Esta acumulación en tejidos foliares representa un problema en el caso de la espinaca, ya que sus hojas se destinan al consumo humano (Gangolli et al., 1994).

La concentración de nitrato, así como su porcentaje en relación al N_{total} , se mantuvo en las plantas de espinaca, a diferencia de las de guisante, sin cambios muy significativos en los tratamientos de fuente mixta. En las plantas de guisante al disminuir la ratio $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ de la solución nutritiva, el contenido de NO_3^- también se vio reducido. Nuestros resultados con espinaca coinciden y los de guisante difieren de los de Helali et al. (2010); estos autores observaron que la concentración de NO_3^- en los tejidos de *Arabidopsis* se mantuvieron con el mismo valor en los medios con $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+ \geq 1$, a pesar de las grandes diferencias en la concentración absoluta de NH_4^+ entre estos medios. Estos autores concluyen que la nutrición N parecía poco sensible a la presencia de NH_4^+ en el medio cuando el NO_3^- se suministraba simultáneamente a las plantas en concentraciones inferiores a las del NH_4^+ . Según proponen Raab y Terry (1994), la reducción del crecimiento de las plantas tratadas solo con NH_4^+ podría ser causada por la falta de NO_3^- como un importante anión osmótico para la expansión celular de las hojas y/o por la reducción de la síntesis de ácidos orgánicos. Estos resultados parecen estar correlacionados con las cinéticas de absorción observadas en espinaca y guisante cuando ambas formas nitrogenadas (amonio y nitrato) están simultáneamente presentes en la solución; en ambos casos la forma nitrogenada preferentemente absorbida es la amoniacal, la cual presenta la misma intensidad en su absorción en ambas especies en el tiempo estudiado; resultados similares han sido descritos por

varios autores (Hachiya et al., 2012; Kronzucker et al., 1999 a,b; Hachiya y Sakakibara, 2017), aunque la translocación de amonio o productos derivados de la asimilación del amonio absorbido es translocado a parte aérea en mayor proporción en espinaca que en guisante como muestran los resultados de las cinéticas de absorción. Por el contrario, la capacidad de absorber el nitrato presenta diferencias significativas, teniendo las plantas de espinaca una capacidad de absorber nitrato doble de la del guisante, todos estos aspectos podrían estar relacionados tanto con la sensibilidad que la espinaca presenta a la nutrición amoniacal como a la respuesta en el mantenimiento de los niveles de nitrato en los tejidos.

4.6. CONCLUSIONES

En el presente capítulo hemos estudiado el efecto del nitrato en el crecimiento de plantas de espinaca y guisante, especies con diferente sensibilidad a la nutrición amoniacal, bajo una nutrición nitrogenada mixta con distintos ratios amonio y nitrato. En nuestras condiciones de ensayo la nutrición mixta mostró un efecto beneficioso y similar a nitrato en el crecimiento de las dos especies cuando se compara con la nutrición amoniacal como única fuente de N. El efecto de reversión de la toxicidad de amonio por un incremento en la proporción de nitrato se hace más patente en espinaca que en guisante. Una diferencia significativa encontrada entre ambas especies está relacionada con el mantenimiento de los niveles internos de amonio en los tejidos bajo las diferentes condiciones de crecimiento, ya que mientras en espinaca esos valores variaban en función de la concentración de amonio en el medio, especialmente para el tratamiento de solo amonio, el guisante era capaz de mantener constantes esos niveles, incluso creciendo solo con amonio como única fuente de N. Estos resultados abren nuevas expectativas de estudio para saber dónde reside el efecto beneficioso de una nutrición mixta y la tolerancia al amonio.

CONCLUSIONES GENERALES

- Los inhibidores de la nitrificación (DMPP y DMPSA) fueron absorbidos por la raíz y translocados a la parte aérea en las plantas de trébol (*Trifolium incarnatum*) y Lotus (*Lotus japonicus*). El DMPP se translocó y se acumuló preferentemente en las hojas, mientras que el DMPSA se concentró preferentemente en la raíz. Las dos isoformas del DMPSA se mantienen en el interior de los tejidos en la misma proporción que su formulación química.
- En presencia de dosis muy elevadas de DMPP (100 mg L⁻¹), tanto las plantas de trébol como las de Lotus presentaron síntomas de toxicidad. La misma dosis de DMPSA (100 mg L⁻¹) resultó inocua para las plantas.
- Del estudio proteómico y transcriptómico en plantas de Lotus se puede concluir que el DMPP no produce un efecto fitotóxico acusado, si bien se intuye una posible inducción de estrés oxidativo.
- En el estudio fisiológico, las plantas de Lotus se vieron afectadas por el inhibidor en el metabolismo redox, metabolismo hormonal y metabolismo de N. Los resultados manifiestan una posible senescencia temprana.
- El inhibidor DMPP fue más eficaz que el DMPSA inhibiendo la nitrificación en un cultivo de bacterias oxidantes de amonio (AMO y HAO), ya que el contenido de amonio se mantuvo a niveles más altos que en el que se añadió DMPSA.
- El DMPP es estable en el medio de cultivo ya que la concentración final fue la misma que la aplicada al inicio del ensayo. Sin embargo, el DMPSA a diferencia del DMPP, presentó concentraciones inferiores a las aplicadas inicialmente.
- El aumento en la proporción de nitrato en la ratio NH₄⁺/NO₃⁻, mejora el crecimiento de la plantas hasta valores similares a la nutrición nítrica.
- La toxicidad que provoca el aporte de amonio cuando se aplica como única fuente de N es mayor en plantas de espinaca que en plantas de guisante y se propone que dicha toxicidad está relacionada con la mayor acumulación de amonio en los tejidos.
-

CONCLUSÕES GERAIS

- Os inibidores da nitrificação (DMPP e DMPSA) foram absorvidos e transportados da raiz para a parte aérea das plantas de trevo (*Trifolium incarnatum*) y lócus (*Lotus japonicus*). O DMPP foi preferencialmente acumulado nas folhas, enquanto o DMPSA se concentrou preferencialmente na raiz. As duas isoformas da DMPSA são mantidas dentro dos tecidos vegetais na mesma proporção que a formulação química.
- Na presença de altas doses de DMPP (100 mg L⁻¹), tanto as plantas de trevo como as plantas de Lócus apresentaram sintomas de toxicidade. O inibidor DMPSA parece ser inofensivo para as plantas.
- No estudo proteômico e transcriptômico com plantas de lócus concluímos que o inibidor DMPP não produz um efeito pronunciado de fitotoxicidade, embora uma possível indução a um stress oxidativo é intuída.
- No estudo fisiológico, as plantas de lócus foram afectadas pelo inibidor no metabolismo redox, metabolismo hormonal e metabolismo de N. Os resultados mostram um possível início de senescência.
- Na cultura de bactérias oxidantes de amónio (AMO e HAO), o inibidor DMPP foi mais eficaz que o inibidor DMPSA na inibição da nitrificação, uma vez que manteve maiores concentrações de amónia na cultura por um período mais longo do que o inibidor DMPSA.
- O inibidor DMPP, demonstra uma estabilidade no meio de cultura, uma vez que a concentração final deste inibidor foi idêntica à aplicada no início do teste. O inibidor DMPSA, ao contrário do inibidor DMPP apresentou concentrações mais baixas de inibidor do que as concentrações adicionadas inicialmente.
- O aumento na proporção de nitrato na relação NH₄⁺/NO₃⁻ melhora o crescimento das plantas em até valores semelhantes à nutrição a base de nitrato, como única fonte de N.
- Os sintomas de toxicidade apresentado pelas plantas quando a amónia é adicionada sendo a única fonte de N, é maior nas plantas de espinafre do que nas plantas de ervilha e parece estar relacionada com uma maior acumulação de amónia nos tecidos vegetais das plantas de espinafre.

GENERAL CONCLUSIONS

- The nitrification inhibitors (DMPP and DMP SA) were absorbed by the root and translocated to the shoot in the clover plants (*Trifolium incarnatum*) and Lotus (*Lotus japonicus*). DMPP was translocated and accumulated preferentially in the shoot, whereas DMP SA was concentrated preferentially in the root. The two isoforms of the DMP SA are kept inside the tissues in the same proportion as their chemical formulation.
- In presence of high doses of DMPP (100 mg L⁻¹), both clover plants and Lotus presented toxicity symptoms. The same dose of DMP SA (100 mg L⁻¹) was harmless for the plants.
- From the proteomic and transcriptomic study in Lotus plants it can be concluded that DMPP does not produce a marked phytotoxic effect, although a possible induction of oxidative stress is suggested.
- In the physiological study, the Lotus plants were affected by the DMPP inhibitor in the redox metabolism, the hormonal metabolism and the N metabolism. Results showed a possible early senescence of the plants.
- DMPP inhibitor was more effective than DMP SA in the inhibition of nitrification in a culture of ammonium oxidizing bacteria (AMO and HAO), since the ammonium content was maintained at higher levels than that in which DMP SA was applied.
- DMPP is stable in the culture medium since the final concentration was the same as that applied at the beginning of the test. However, the DMP SA, unlike the DMPP, presented lower concentrations than those initially applied.
- The increase in the proportion of nitrate in the ratio NH₄⁺/NO₃⁻, improves the growth of plants up to values similar to nitrate nutrition.
- The toxicity caused by the contribution of ammonia when applied as the only source of nitrogen in spinach plants is higher than pea plants and it is proposed this toxicity is related to the greater accumulation of ammonium in the tissues.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalos, D.; Jeffery, S.; Sanz-Cobena, A.; Guardia, G.; Vallejo, A. Meta-analysis of the effect of urease and nitrification inhibitors on crop productivity and nitrogen use efficiency Agric. Ecosyst. Environ. 2014, 189: 136-144.

Akiyama, H.; Yan, X.; Yagi, K. Evaluation of effectiveness of enhanced-efficiency fertilizers as mitigation options for N₂O and NO emissions from agricultural soils: Meta-analysis. Glob. Chang. Biol. 2010, 16: 1837–1846.

Allen, R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol 1995, 107:1049–54.

Andreae, M. ENTEC (DMPP – ein neuer Ammonium-stabilisator: ökotoxikologische Bewertung. In: Düngen mit einer neuen Technologie – Innovation in der Düngung. Wissenschaftliches Kolloquium Agrarzentrum der BASF Limburgerhof, 17. Bis 1999, 18:3–10.

Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Annu. Rev. Plant Biol. 2004, 55: 373–399.

Araújo, W. L.; Nunes-Nesi, A.; Nikoloski, Z.; Sweetlove, L. J. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. Plant Cell Environ 2012, 35: 1–21.

Araújo, W. L.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A. R. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. Photosynth. Res. 2014, 119: 141–156.

Ariz, I.; Artola, E.; Asensio, A. C.; Cruchaga, S.; Aparicio-Tejo, P. M.; Moran, J. F. High irradiance increases NH₄⁺ tolerance in *Pisum sativum*: Higher carbon and energy availability improve ion balance but not N assimilation. J Plant Physiol. 2011, 168 (10): 1009-1015.

Ariz, I.; Cruchaga, S.; Lasa, B.; Moran, J. F.; Jauregui, I.; Aparicio-Tejo, P. M. The physiological implications of urease inhibitors on N metabolism during germination of *Pisum sativum* and *Spinacea oleracea* seeds. J. Plant Physiol. 2012, 169: 673–681.

Ariz, I.; Cruz, C.; Moran J. F.; González-Moro, M. B.; García-Olaverri C.; González-Murua, C.; Martins-Louçao, M. A.; Aparicio-Tejo, P. A. Depletion of the heaviest stable N isotope is associated with $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ toxicity in NH_4^+ -fed plants. BMC Plant Biol. 2011, 11: 83.

Ariz, I.; Marini, A. M.; Aparicio-Tejo, P. M.; Boeckstaens, M.; Martins, A. P.; Soveral, G.; Gouveia, C.; Fernández, E.; Sanz-Luque, E.; von Wirén, N.; Cruz, C. N isotope signature supports NH_4^+ deprotonation as a common transport mechanism of the Amt-Mep-Rh protein superfamily. Science Advances 2018 (submitted).

Armendáriz, O.; Gil-Monreal, M.; Zulet, A.; Zabalza, A.; Royuela, M. Both foliar and residual applications of herbicides that inhibit amino acid biosynthesis induce alternative respiration and aerobic fermentation in pea roots. Plant Biol. 2015: 382-390.

Arora, A.; Sairam, R. K.; Srivastava, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Curr. Sci 2002. 82:1227-1238.

Artola, E.; Cruchaga, S.; Ariz, I.; Moran, J. F.; Garnica, M.; Houdusse, F.; Garcia-Mina, J. M.; Irigoyen, I.; Lasa, B.; Aparicio-Tejo, P. M. Effect of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on urea metabolism and the assimilation of ammonium by *Triticum aestivum* L. Plant Growth Regul. 2011, 63: 73-79.

Ashraf, M.; Akram, N. A.; Arteca, R. N.; Foolad, M. R. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. Crit. Rev. Plant Sci. 2010, 29 (3): 162-190.

Atkin, O. K.; Macherel, D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Annals of Botany 2009, 103 (4): 581-597.

Babiychuk, E.; Kushnir, S.; Van Montagu, M.; Inze, D. The *Arabidopsis thaliana* apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994, 91: 3299-3303.

Barrena, I.; Menéndez, S.; Bedmar, E. J.; Correa-Galeote, D.; Vega-Mas, I.; González-Murua, C.; Estavillo, J. M. Soil water content modulates the effect of the

nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) on nitrifying and denitrifying bacteria. *Geoderma* 2017, 303: 1–8.

Barth, G.; Von Tucher, S.; Schmidhalter, U. Effectiveness of 3,4-dimethylpyrazole phosphate as nitrification inhibitor in soil as influenced by inhibitor concentration, application form, and soil matric potential. *Pedosphere* 2008, 18:378–385.

Belastegui-Macadam, X. M.; Estavillo, J. M.; García-Mina, J. M.; González, A.; Bastias, E.; Gónzalez-Murua, C. Clover and ryegrass are tolerant species to ammonium nutrition. *Journal of Plant Physiology* 2007, 164: 1583-1594.

Benckiser, G.; Christ, E.; Herbert, T.; Weiske, A.; Blome, J.; Hardt, M. The nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole-phosphate (DMPP) - quantification and effects on soil metabolism. *Plant Soil* 2013, 371: 257–266.

Betti, M.; Pérez-Delgado, C.; García-Calderón, M.; Díaz, P.; Monza, J.; Márquez, A. J. Cellular stress following water deprivation in the model legume *Lotus japonicus*. *Cell* 2012, 1 (4):1089–06.

Bloom, A. J.; Sukrapanna, S. S.; Warner, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation in barley. *Plant Physiology*. 1992, 99: 1294–1301.

Bock, E.; Wagner, M. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In *Prokaryotes* 2006, 457–495.

Bock, E.; Wagner, M. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as an Energy Source. *Prokaryotes* vol. 2 chapter 1. 2006, 16: 457–495.

Bouché, N.; Fromm, H. GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 2004, 9: 110–115.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.

Breitling, R.; Armengaud, P.; Amtmann, A.; Herzyk, P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett.* 2004, 573: 83-92.

Bremner, J. M.; Krogmeier, M. J. Effects of nitrification inhibitors on germination of various seeds in soil. *Biol. Fertil. Soils* 1989, 8: 369–372.

Britto, D. T.; Kronzucker, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiology.* 2002, 159: 567-584.

Britto, D. T.; Kronzucker, H. J. Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. *Journal of Crop Improvement.* 2005b, 15:1–23.

Britto, D. T.; Kronzucker, H. J.; Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. *Annals of Botany.* 2013, 112(6):957-963.

Cakmak, I.; Horst, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 1991, 83: 463–468.

Calzadilla, P. I.; Maiale, S. J.; Ruiz, O. A.; Escaray, F. J. Transcriptome Response Mediated by Cold Stress in *Lotus japonicus*. *Frontiers in Plant Science* 2016, 7: 374.

Cameron, K. C.; Di, H. J.; Moir, J. L.; Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals of Applied Biology* 2013, 162: 145-173.

Chapin, F. S. New cog in the nitrogen-cycle. *Nature* 1995, 377:199-200.

Chen, X.; Zhang, L. M.; Shen, J. P.; Wei, W. X.; He, J. Z. Abundance and community structure of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in an acid paddy soil. *Biol Fertil Soils* 2011, 47:323-331.

Chen, X. H.; Zhou, L. X.; Zhao, Y. G.; Pan, S. D.; Jin, M. C. Application of nanoring amino-functionalized magnetic polymer dispersive micro-solid-phase extraction and ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry in dicyandiamide residue analysis of powdered milk. *Talanta* 2014, 119: 187–192.

Clarke, S. M.; Cristescu, S. M.; Miersch, O.; Harren, F. J. M.; Wasternack, C.; Mur, L. A. Jasmonates act with salicylic acid to confer basal thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 2009, 182: 175-187.

Coruzzi, G. M.; Zhou, L. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects.' *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001, 4: 247–253.

Coskun, D.; Britto, D. T.; Shi, W.; Kronzucker, H. J.; How Plant Root Exudates Shape the Nitrogen Cycle. *Trends in Plant Science*, 22 (8): 661 – 673.

Crawford, N. M.; Forde, B. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists 2002, 1: e0011.

Cren, M.; Hirel, B. Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol.* 1999, 40: 1187–1193.

Cruchaga, S.; Artola, E.; Lasa, B.; Ariz, I.; Irigoyen, I.; Moran, J. F.; Aparicio-Tejo, P. M. Short term physiological implications of NBPT application on the N metabolism of *Pisum sativum* and *Spinacea oleracea*. *J. Plant Physiology* 2011, 168: 329–336.

Cruchaga, S.; Lasa, B.; Jauregui, I.; González-Murua, C.; Aparicio-Tejo, P. M.; Ariz, I. Inhibition of endogenous urease activity by NBPT application reveals differential N metabolism responses to ammonium or nitrate nutrition in pea plants: a physiological study. *Plant Soil* 2013, 373: 813–827.

Cruz, C.; Lips, H.; Martins-Loução, M. A. Nitrogen use efficiency by a slow-growing species as affected by CO₂ levels, root temperature, N source and availability. *Journal of Plant Physiology* 2003, 160: 1421–1428.

Daims, H.; Lebedeva, E. V.; Pjevac, P.; Han, P.; Herbold, C.; Albertsen, M.; Jehmlich, N.; Palatinszky, M.; Vierheilig, J.; Bulaev, A.; Kirkegaard, R. H.; von Bergen, M.; Rattei, T.; Bendinger, B.; Nielsen, P. H.; Wagner, M. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 2015, 528:504–509.

Dalton, D. A. Antioxidant defenses of plants and fungi. In S Ahmad, ed, *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Springer 1995: 298–355.

Dalton, T. P.; Shertzer, H. G.; Puga, A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1999, 39: 67-101.

de la Torre, J. R.; Walker, C. B.; Ingalls, A. E.; Konneke, M.; Stahl, D. A. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology* 2008, 10: 810-818.

Del Grosso S. J.; Parton, W. J.; Mosier, A. R.; Walsh, M. K.; Ojima, D. S.; Thornton, P. E. DAYCENT National-scale simulations of nitrous oxide emissions from cropped soils in the United States. *J Environ. Qual.* 2016, 35: 1451–1460.

Delatorre, C.; Rodríguez, A.; Rodríguez, L.; Majada, J. P.; Ordás, R. J.; Feito, I. Hormonal profiling: Development of a simple method to extract and quantify phytohormones in complex matrices by UHPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* 2017, 1040; 239-249.

Denancé, N.; Sánchez-Vallet, A.; Goffner, D.; Molina, A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Front. Plant Sci.* 2013, 4:155.

Denman, K. L.; Brasseur, G.; Chidthaisong, A.; Ciais, P.; Cox, P. M.; Dickinson, R. E.; Hauglustaine, D.; Heinze, C.; Holland, E.; Jacob, D.; Lohmann, U.; Ramachandran, S.; da Silva Dias, P. L.; Wofsy, S. C.; Zhang, X. Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Core Writing Team, S. S., D. Q., Z. M., M. M., Z. C.; M. M., K. B. A., M. T. and H. L. M., Eds.: Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.*

Dennis, S. J.; Cameron, K. C.; Di, H. J.; Moir, J. L.; Staples, V.; Sills, P.; Richards, K. G. Reducing nitrate losses from simulated grazing on grassland lysimeters in Ireland using a nitrification inhibitor (Dicyandiamide). *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* 2012, 112: 1–11.

Di, H. J.; Cameron, K. C. Treating grazed pasture soil with a nitrification inhibitor, eco-nTM, to decrease nitrate leaching in a deep sandy soil under spray irrigation– a lysimeter study. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2004, 47: 351–361.

Di, H. J.; Cameron, K. C.; Podolyan, A.; Robinson, A. Effect of soil moisture status and a nitrification inhibitor, dicyandiamide, on ammonia oxidizer and denitrifier growth and nitrous oxide emissions in a grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 2014, 73: 59–68.

Di, H. J.; Cameron, K. C.; Sherlock, R. R.; Shen, J. P.; He, J. Z.; Winefield, C. S. Nitrous oxide emissions from grazed grassland as affected by a nitrification inhibitor, dicyandiamide, and relationships with ammonia-oxidizing bacteria and archaea. *J Soils Sediments* 2010, 10: 943–954.

Di, H. J.; Cameron, K. C.; Shen, J. P.; Winefield, C. S.; Ocallaghan, M.; Bowatte, S.; He, J. Z. Nitrification driven by bacteria and not archaea in nitrogen-rich grassland soils. *Nature Geoscience* 2009, 9: 621-624.

Dias, T.; Martins-Louçao, M.A.; Sheppard, L.; Cruz, C. The strength of the biotic compartment in retaining nitrogen additions prevents nitrogen losses from a Mediterranean maquis. *Biogeosciences* 2012, 9: 193-201.

Díaz, P.; Betti, M.; Sánchez, D. H.; Udvardi, M. K.; Monza, J.; Márquez, A. J. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *New Phytologist* 2010, 188: 1001–1013.

Díaz, P.; Borsani, O.; Márquez, A.; Monza, J. Nitrogen metabolism in relation to drought stress responses in cultivated and model *Lotus* specie. *Lotus Newsletter* 2005, 7: 83–92.

Díaz-Mendoza, M.; Velasco-Arroyo, B.; Santamaria, M. E.; González-Melendi, P.; Martínez, M.; Díaz, I. Plant senescence and proteolysis: two processes with one destiny. *Genetics and Molecular Biology.* 2016, 39(3): 329-338.

Dijk, E.; Grootjans, A. B. Performance of four *Dactylorhiza* species over a complex trophic gradient. *Acta Bot Neerl.* 1998, 47: 351–368.

Domínguez-Valdivia, M. D.; Aparicio-Tejo, P. M.; Lamfus, C.; Martins-Loução, M. A.; Moran, J. F. Nitrogen nutrition and antioxidant metabolism in ammonium-tolerant and -sensitive plants. *Physiol Plant* 2008, 132: 359–369.

Dong, X. X.; Zhang, L. L.; Wu, Z. J.; Li, D. P.; Shang, Z. C.; Gong, P. Effects of the nitrification inhibitor DMPP on soil bacterial community in a Cambisol in northeast China. *J Soil Sci Plant Nutr.* 2013, 13:580–591.

EEA: Tracking Progress Towards Kyoto and 2020 Targets in Europe. EEA Report No. 7/2010, European Environment Agency (EEA), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2010: 107.

Evans, J. R.; Poorter, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: The relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. *Plant Cell Env.* 2001, 24: 755–767.

Farges, B.; Poughon, L.; Roriz, D.; Creuly, C.; Dussap, C-G.; Lasseur, C.; Axenic cultures of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* in autotrophic conditions: a new protocol for kinetic studies. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012, 167: 1076–1091.

Fernandes, M. S.; Rossiello, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences* 1995, 14 (2): 111-148.

Fiencke, C.; Spieck, E.; Bock, E. Nitrifying bacteria. In: D. Werner & W. E. Newton (eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer, The Netherlands, Dordrecht. 2005, 12: 255-276.

Fowler, D.; Pilegaard, K.; Sutton, M. A.; Ambus, P.; Raivonen, M.; Duyzer, J.; Simpson, D.; Fagerli, H.; Fuzzi, S.; Schjoerring, J. K.; Granier, C.; Neftel, A.; Isaksen, I. S. A.; Laj, P.; Maione, M.; Monkd, P. S.; Burkhardt, J.; Daemmgen, U.; Neirynck, J.; Personne, E.; Wichink-Kruit, R.; Burrerbach-Bahl, K.; Flechard, C.; Tuovinen, J. P.; Coyle, M.; Gerosa, G.; Loubet, B.; Altimir, N.; Gruenhage, L.; Ammann, C.; Cieslik, S.; Paoletti, E.; Mikkelsen, T. N.; Ro-Poulsen, H.; Cellier, P.; Cape J. N.; Horváth, L.; Loreto,

U.; Niinemets, U. Atmospheric composition change: ecosystems-atmosphere interactions. *Atmospheric Environment* 2009, 43: 5193-5267.

Foyer, C. H.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J. F.; Scott, I. M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 1997, 100: 241–254.

Foyer, C. H.; Noctor, G. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 2011, 155 (1): 2-18.

Fuoco, R.; Bogani, P.; Capodaglio, G.; Del Bubba, M.; Abollino, O.; Giannarelli, S.; Spiriti, M. M.; Muscatello, B.; Doumett, S.; Turetta, C.; Zangrando, R.; Zelano, V.; Buiatti, M. Response to metal stress of *Nicotiana langsdorffii* plants wild-type and transgenic for the rat glucocorticoid receptor gene. *J Plant Physiol.* 2013, 170: 668–675.

Gangolli, S. D.; van den Brandt, P. A.; Feron, V. J.; Janzowsky, C.; Koeman, J. H.; Speijers, G. J. A.; Spiegelhalder, B.; Walker, R.; Wishnok, J. S. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European Journal of Pharmacology* 1994, 292: 1-38.

Gariglio, N. F.; Buyatti, M. a.; Pilatti, R. a.; Russia, D. E. G.; Acosta, M. R. Use of a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix sp.*) sawdust. *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.* 2002, 30: 135–139.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Yvin, J.; Garcia-Mina, J. M. Nitrate modifies urea root uptake and assimilation in wheat seedlings, *J. Sci. Food Agric.* 2009, 89: 55-62.

Garnica, M.; Houdusse, F.; Zamarreno, A.M.; Garcia-Mina, J. M. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium, *J. Plant. Physiol.* 2010, 167: 1264-1272.

Gil-Monreal, M.; Zabalza, A.; Tagnon D. M., Dörmann, P.; Bartels, D.; Royuela, M. Induction of the PDH bypass and upregulation of the ALDH7B4 in plants treated with herbicides inhibiting amino acid biosynthesis. *Plant Science*, 2017, 264: 16-28.

Gilsanz, C.; Bàez, D; Misselbrook, T. H.; Dhanoa, M. S.; Càrdenas, L. M. Development of emission factors and efficiency of two nitrification inhibitors, DCD and DMPP. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2016, 216: 1-8.

Giltrap, D. L.; Singh, J.; Saggar, S.; Zaman, M. A preliminary study to model the effects of a nitrification inhibitor on nitrous oxide emissions from urine-amended pasture. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2010, 136: 310-317.

Girousse, C.; Bournoville, R.; Bonnemain, J-L. Water deficit-induced changes in concentrations in proline and some other amino acids in the phloem sap of alfalfa. *Plant Physiol.* 1996, 111: 109–113.

González-Meler, M. A.; Matamala, R.; Penuelas, J. Effects of prolonged drought stress and nitrogen deficiency on the respiratory O₂ uptake of bean and pepper leaves. *Photosynthetica* 1998, 34 (4): 505-512.

Graham, P. H.; Vance, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 2003, 131: 872-877.

Graham, K.; Verhulst, N.; Buerkert, A.; Ortiz-Monasterio, I.; Govaerts, B. Nitrogen use efficiency and optimization of nitrogen fertilization in conservation agriculture. *CAB Reviews* 2013, 8: 1-19.

Graves, P. R.; Haystead, T. A. J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2002, 66 (1):39-63.

Hachiya, T.; Sakakibara, H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants, *Journal of Experimental Botany* 2017, 68 (10): 2501–2512.

Hachiya, T.; Sakakibara, H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. *Journal of Experimental Botany* 2017, 68: 2501–2512.

Hachiya, T.; Watanabe, C. K.; Fujimoto, M.; Ishikawa, T.; Takahara, K.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiya, H.; Uesono, Y.; Terashima, I.; Noguchi, K. Nitrate addition alleviates ammonium toxicity without lessening ammonium accumulation, organic acid

depletion and inorganic cation depletion in *Arabidopsis thaliana* shoots. *Plant & Cell Physiology* 2012, 53: 577–591.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, 2000.

Handberg, K.; Stougaard, J. *Lotus japonicus* an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal* 1992, 2: 487-496.

Hansmann, E. W.; Phinney, H. K. Effects of logging on periphyton in coastal streams of Oregon. *Ecology* 1973, 54:194–199.

Harrison, J.; Brugiére, N.; Philipson, B.; Ferrario-Mery, S.; Becker, T.; Limami, A.; Hirel, B. Manipulating the pathway of ammonia assimilation through genetic engineering and breeding: consequences to plant physiology and plant development. *Plant and Soil* 2000, 221: 81-93.

Hatzenpichler, R. Diversity, physiology, and niche differentiation of ammonia-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78: 7501–7510.

Hayatsu, M.; Tago, K.; Saito, M. Various players in the nitrogen cycle: diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Sci. Plant Nutr.* 2008, 54: 33–45.

Hawkesford, M. J. Genetic variation in traits for nitrogen use efficiency in wheat. *Journal of Experimental Botany* 2017, 68: 2627–2632.

Helali, S. M.; Nebli, H.; Kaddour, R.; Mahmoudi, H.; Lachaal, M.; Ouerghi, Z. Influence of nitrate-ammonium ratio on growth and nutrition of *Arabidopsis thaliana* *Plant and Soil* 2010, 336: 65–74.

Hérouart, D.; Bowler, C.; Willekens, H.; van Camp, W.; Slooten, L.; van Montagu, M.; Inzé, D. Genetic engineering of oxidative stress resistance in higher plants. *Philos Trans R Soc Lond B.* 1993, 342:235–240.

Herrero-Martínez, J. M.; Simó-Alfonso, E. F.; Ramis-Ramos, G. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, glutathione, and their oxidized forms in ozone-exposed

vascular plants by capillary zone electrophoresis. *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34: 1331–1336.

Hesselsøe, M.; Brandt, K. K.; Sorensen, J. Quantification of ammonia oxidizing bacteria in soil using microcolony technique combined with fluorescence in situ hybridization (MCFU-FISH). *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001, 38:87-95.

Hodges, D. M.; DeLong, J. M.; Forney, C. F.; Prange, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 1999, 207: 604–611.

Hong, S. L.; Feng, M. L. Root respiration, photosynthesis and grain yield of two spring wheat in response to soil drying. *Plant Growth Regul.* 2005, 46: 233–240.

Hood-Nowotny, R.; Umana, N. H.-N.; Inselbacher, E.; Oswald- Lachouani, P.; Wanek, W. Alternative methods for measuring inorganic, organic, and total dissolved nitrogen in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 2010, 74: 1018–1027.

Huang, C. Y.; Boyer, J. S.; Vanderhoef, L. N. Limitation of acetylene reduction (nitrogen fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. *Plant Physiol* 1975, 56: 228–32.

Huérffano, X.; Fuertes-Mendizábal, T.; Fernandez-Diez, K.; Estavillo, J. M.; González-Murua, C.; Menéndez, S. The new nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole succinic (DMPSA) as an alternative to DMPP for reducing N₂O emissions from wheat crops under humid Mediterranean conditions. *Eur. J. Agron.* 2016, 80: 78–87.

Hutchinson, G.L.; Davidson, E.A.; Processes for production and consumption of gaseous nitrogen-oxides in soil. *Agric. Ecosyst. Eff. Trace Gases Glob. Clim. Chang.* 1993, 55: 79-93.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). Fifth Assessment Report - Synthesis Report Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Core Writing Team, R. K. P. and L. A. M., Ed.; Geneva, Switzerland, 2014.

Junges, C. M.; Vidal, E. E.; Attademo, A. M.; Mariani, M. L.; Cardell, L.; Negro, A. C.; Cassano, A.; Peltzer, P. M.; Lajmanovich, R. C.; Zalazar, C. S. Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H₂O₂/UVC process: toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles. J. Environ. Sci. Health. B. 2013, 48 (3), 163–170.

Junier, P.; Molina, V.; Dorador, C.; Hadas, O.; Kim, O.; Junier, T.; Witzel, K.; Imhoff, J. F. Phylogenetic and functional marker genes to study ammonia-oxidizing microorganisms (AOM) in the environment. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 85: 425–440.

Khana-Chopra, R. Leaf senescence and abiotic stresses share reactive oxygen species-mediated chloroplast degradation. Protoplasma 2012, 249: 469-481.

Kim, D. G.; Giltrap, D.; Saggar, S.; Palmada, T.; Berben, P.; Drysdale, D. Fate of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) sprayed on a grazed pasture: Effect of rate and time of application. Soil Res. 2012, 50: 337–347.

Kirby, E. A. Plant growth in relation to nitrogen supply. Terrestrial Nitrogen Cycles, Processes, Ecosystem Strategies and Management Impacts – Ecol. Bull Stockholm 1981: 249-267.

Kistner, C.; Matamoros, M. RNA isolation using phase extraction and LiCl precipitation. Lotus japonicus Handbook, Springer Verlag, Dordrecht 2005: 123-124.

Klapheck, S. Homoglutathione: isolation, quantification, and occurrence in legumes. Physiologia Plantarum 1988, 74: 727–732.

Kolb, K. J.; Evans, R. D. Influence of nitrogen source and concentration on nitrogen isotopic discrimination in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell and Environment 2003, 26: 1431–1440.

Komander, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. Biochem. Soc. Trans. 2009, 37: 937-953.

Kong, X.; Duan, Y.; Schramm, A.; Eriksen, J.; Petersen, S. O. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) reduces activity of ammonia oxidizers without

adverse effects on non-target soil microorganisms and functions. *Appl. Soil Ecol.* 2016, 105: 67–75.

Konneke, M.; Bernhard, A. E.; de la Torre, J. R.; Walker, C. B.; Waterbury J. B.; Stahl D. A. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 2005, 437: 543-546.

Kox, M. A.; Jetten, M. S. The Nitrogen Cycle. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* Springer International Publishing 2015: 205-214.

Kramer, P. J.; Boyer, J. S. *Water relations of plants and soils.* Academic press 1995.

Kronzucker, H. J.; Siddiqi, M. Y.; Glass, A. D. M.; Kirk, G. J. D. Nitrate- ammonium synergism in rice: A subcellular analysis. *Plant Physiol.* 1999a, 119: 1041-1046.

Kronzucker, H. J.; Glass, A. D. M.; Siddiqi, M. Y. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley Analysis of component fluxes. *Plant Physiol.* 1999b, 120: 283-292.

Kronzucker, H. J.; Szczerba, M. W.; Britto, D. T. Cytosolic potassium homeostasis revisited: 42K-tracer analysis in *Hordeum vulgare* L. reveals set-point variations in [K⁺]. *Planta* 2003, 217: 540–546.

Labhilili, M.; Houdrier, P.; Cautier, M. Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Sci* 1995, 112: 219–30.

Lasa, B.; Frechilla, S.; Aparicio-Tejo, P. M; Lamfus, C. Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylate activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiol. Biochem.* 2002, 40: 969-976.

Lasa, B.; Frechilla, S.; Lamfus, C.; Aparicio-Tejo, P. M. The sensitivity to ammonium nutrition is related to nitrogen accumulation. *Sci. Hortic.* 2001, 91: 143-152.

Lavalle, C.; Micale, F.; Houston, T. D.; Camia, A.; Hiederer, R.; Lazar, C.; Conte, C.; Amatulli, G.; Genovese, G. Climate change in Europe. 3. Impact on agriculture and forestry. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2009, 29 (3), 433-446.

Legume research in the fast lane. *Trends in Plant Sciences* 2005,10: 222-228.

Leidi, E.O.; Nogales, R.; Lips, S. H. Effect of salinity on cotton plants grown under nitrate or ammonium nutrition at different calcium levels. *Field Crops Research* 1991, 26: 35-44.

Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. J. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 1994, 79: 583–593.

Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.; Ahn, B.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzimol* 1990, 186: 464-479.

Lewis, O. A. M. *Plants and nitrogen*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1992.

Li, H.; Liang, X.; Chen, Y.; Lian, Y.; Tian, G.; Ni, W. Effect of nitrification inhibitor DMPP on nitrogen leaching nitrifying organisms and enzyme activities in a rice-oilseed rape cropping system. *J. Environ. Sci. (China)*, 2008, 20: 149-155.

Linzmeier, W.; Gutser, R.; Schmidhalter, U. Nitrous oxide emission from soil and from a 15N-labelled fertilizer with the new nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP). *Biol Fertil Soils* 2001, 34: 103–108.

Liu, C.; Wang, K.; Zheng, X. Effect of nitrification inhibitors (DCD and DMPP) on nitrous oxide emission, crop yield and nitrogen uptake in a wheat-maize cropping system. *Biogeosciences* 2013, 10: 2427-2437.

Liu, X.; Lu, L.; Chen, Q.; Ding, W.; Dai, P.; Hu, Y.; Yu, Y.; Jin, C.; Lin, X. Ammonium reduces oxalate accumulation in different spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes by inhibiting root uptake of nitrate. *Food Chem.* 2015, 186: 312-318.

Loick, N.; Dixon, E. R.; Abalos, D.; Vallejo, A.; Matthews, G. P.; McGeough, K. L.; Well R.; Watson, C. J.; Laughlin, R. J.; Cardenas, L. M.; Denitrification as a source of nitric oxide emissions from incubated soil cores from a UK grassland soil. *Soil Biol. Biochem.* 2016, 95: 1–7.

Lowe, R.; Shirley, N.; Bleackley, M.; Dolan, S.; Shafee, T. Transcriptomics technologies. PLoS Computational Biology 2017, 13 (5): e1005457.

Macadam, X. M. B.; del Prado, A.; Merino, P.; Estavillo, J. M.; Pinto, M.; González-Murua, C. Dicyandiamide and 3,4-dimethyl pyrazole phosphate decrease N₂O emissions from grassland but dicyandiamide produces deleterious effects in clover. J. Plant Physiol. 2003, 160: 1517–1523.

Maftoun, M.; Sameni, A. M.; Darbeheshti, M.; Yasrebi, J.; Hojjati, S. M. Toxicity of nitrapyrin to sunflower under different N nutrition regimes. Plant Soil 1982, 65: 411–414.

Maftoun, M.; Yasrebi, J.; Darbeheshti, M. Comparative phytotoxicity of nitrapyrin and ATC to several leguminous species. Plant Soil 1981, 63: 303–306.

Maksymiec, W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. Acta Physiol. Plant 2007, 29: 177:187.

Marino, D.; Ariz, I.; Lasa, B.; Santamaría, E.; Fernández-Irigoyen, J.; González-Murua, C.; Aparicio Tejo, P.M. Quantitative proteomics reveals the importance of nitrogen source to control glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. J. of Experim. Botany 20016, 67 (11): 3313-3323.

Márquez, A. J.; Betti, M.; García-Calderón, M.; Palove-Balang, P.; Díaz, P.; Monza, J. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*. J. of Experim. Botany 2005, 56: 1741-1749.

Marschner, H. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd Ed. London: Academic Press, 2012.

Marsden, K. A.; Marín-Martínez, A. J.; Vallejo, A.; Hill, P. W.; Jones, D. L.; Chadwick, D. R. The mobility of nitrification inhibitors under simulated ruminant urine deposition and rainfall: a comparison between DCD and DMPP. Biol. Fertil. Soils 2016: 1–13.

Marsden, K. A.; Scowen, M.; Hill, P. W.; Jones, D. L.; Chadwick, D. R. Plant acquisition and metabolism of the synthetic nitrification inhibitor dicyandiamide and naturally-occurring guanidine from agricultural soils. *Plant Soil* 2015, 395: 201–214.

Martinez, F.; Palencia, P.; Weiland, C.M.; Alonso, D.; Oliveira, J. A. Influence of nitrification inhibitor DMPP on yield: fruit quality and SPAD values of strawberry plants. *Sci. Hortic.* 2015, 185: 233-239.

Matamoros, M. A.; Moran, J. F.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Rubio, M. C.; Becana, M. Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 1999, 121: 879–888.

May, M. J.; Leaver, C. J. Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* 1993, 103: 621-67.

McCarty, G. W. Modes of action of nitrification inhibitors. *Biol. Fertil. Soils* 1999, 29: 1–9.

McCarty, G. W.; Bremner, J. M. Evaluation of 3-methylpyrazole-1-carboxamide as a soil nitrification inhibitor. *Biol. Fertil. Soils* 1990, 9: 252–256.

McGeough, K. L.; Watson, C. J.; Müller, C.; Laughlin, R. J.; Chadwick, D. R. Evidence that the efficacy of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) is affected by soil properties in UK soils. *Soil Biology and Biochemistry* 2016, 94:222.

Medinets, S.; Skiba, U.; Rennenberg, H.; Butterbach-Bahl, K. A review of soil NO transformation: associated processes and possible physiological significance on organisms. *Soil Biology and Biochemistry* 2015, 80:92-117.

Menéndez, S.; Barrena, I.; Setien, I.; González-Murua, C.; Estavillo, J. M. Efficiency of nitrification inhibitor DMPP to reduce nitrous oxide emissions under different temperature and moisture conditions. *Soil Biololy and Biochemistry* 2012, 53: 82-89.

Menéndez, S.; Merino, P.; Pinto, M.; González-Murua, C.; Estavillo, J. M. 3,4-Dimethylpyrazol phosphate effect on nitrous oxide, nitric oxide, ammonia, and carbon dioxide emissions from grasslands. *J. Environ. Qual.* 2006, 35: 973–981.

Meng, S.; Peng, J. S.; He, Y. N.; Zhang, G. B.; Yi, H. Y.; Fu, Y. L.; Gong, J. M. *Arabidopsis* NRT1.5 mediates the suppression of nitrate starvation-induced leaf senescence by modulating foliar potassium level. *Mol Plant* 2016, 9: 461-470.

Mengel, K.; Kirkby, E. A. Principles of plant nutrition. International Potash Institute, 1987: 687.

Merino, P.; Artetxe, A.; Castellón, A.; Menéndez, S.; Aizpurua, A.; Estavillo, J. M. Warming potential of N₂O emissions from rapeseed crop in Northern Spain. *Soil Till. Res.* 2012, 123: 29–34.

Miflin, B. J.; Habash, D. Z. The role glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J. Exp. Bot.* 2002, 53: 979-987.

Miflin, B. J.; Lea, P. J. Amino acids and Derivatives. *The Biochemistry of Plants*-Academic Press, NY. 1980: 169-202.

Mishra, S.; Jha, A. B.; Dubey, R. S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatins synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* 2011, 248: 565-577.

Miura, K.; Tada, Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Front. Plant Sci.* 2014, 5: 1:12.

Mochida, K.; Shinozaki, K. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. *Plant and Cell Physiology*, 2010, 51 (4): 497-523.

Moir, J. L.; Malcolm, B. J.; Cameron, K. C.; Di, H. J. The effect of dicyandiamide on pasture nitrate concentration, yield and N offtake under high N loading in winter and spring. *Grass and Forage Science* 2012, 67: 391–402.

Monaghan, R. M.; Smith, L. C.; Ledgard, S. F. The effectiveness of a granular formulation of dicyandiamide (DCD) in limiting nitrate leaching from a grazed dairy pasture. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2009, 52: 145–159.

Moran, J. F.; Iturbe-Ormaetxe, I.; Matamoros, M. A.; Rubio, M. C.; Clemente, M. R.; Brewin, N. J.; Becana, M. Glutathione and homoglutathione synthetases of legume

nodules: cloning, expression, and subcellular localization. *Plant Physiology* 2000, 124 (3): 1381-92.

Neera, G.; Ranju, S. Growth, photosynthesis nodule nitrogen and carbon fixation in chickpea cultivars under salt stress. *Brazilian J. Plant Physiol.* 2004, 16: 137-146.

Noctor, G.; Foyer, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, 49: 249-279.

Norton, J. M.; Stark, J. M. Regulation and Measurement of Nitrification in Terrestrial Systems. *Methods in Enzymology* 2011, 486: 343-368.

Nunes-Nesi, A.; Araújo, W. L.; Fernie, A. R. Targeting mitochondrial metabolism and machinery as a means to enhance photosynthesis. *Plant Physiol.* 2011, 155: 101–107.

Oaks, A. A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *Bioscience* 1992, 42: 103–110.

Oenema, O.; D. Oudendag; G. L.Velthof. Nutrient losses from manure management in the European Union. *Livestock Sci.* 2007, 112: 261–272.

Pacholski, A.; Berger, N.; Bustamante, I.; Ruser, R.; Guardia, G.; Mannheim T. 2016. Effects of the novel nitrification inhibitor DMPSA on yield, mineral N dynamics and N₂O emissions. *Proceedings of the 2016 International Nitrogen Initiative Conference, "Solutions to improve nitrogen use efficiency for the world", 4–8 December 2016, Melbourne, Australia, www.ini2016.com.*

Pal, P.; McMillan, A. M. S.; Sagggar, S. Pathways of dicyandiamide uptake in pasture plants: a laboratory study. *Biol. Fertil. Soils* 2016, 52: 539–546.

Pastori, G. M.; Kiddle, G.; Antoniow, J.; Bernard, S.; Veljovic-Jovanovic, S.; Verrier, P. J.; Noctor, G.; Foyer, C. H. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* 2003, 15: 939–951.

Peuke, A. D.; Jeschke, W. D. The effects of light on induction, time courses and kinetic patterns of net nitrate uptake in barley. *Plant, Cell and Environment* 1998, 21, 765–774.

Phukan, U. J.; Jeena, G. S.; Tripathi, V.; Shukla, R. K. Regulation of *Apetala2*/Ethylene response factors in plants. *Frontiers in Plant Science* 2017, 8: 150.

Prather, M. J.; Hsu, J. Coupling of Nitrous Oxide and Methane by Global Atmospheric Chemistry. *Science* 2010, 330: 952-954.

Prosser J. I.; Nicol G. W. Relative Contributions of archaea and bacteria to aerobic ammonia oxidation in the environment. *Environmental Microbiology* 2008, 10: 2931-2941.

Puppo, A.; Groten, K.; Bastian, F.; Carzaniga, R.; Soussi, M.; Lucas, M. M.; de Felipe, M. R.; Harrison, J.; Vanacker, H.; Foyer, C. H. Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol.* 2005, 165: 683-701.

Purkhold, U.; Pommerening-Röser, A.; Juretschko, S.; Schmid, M. C.; Koops, H. P.; Wagner, M. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66: 5368–5382.

Quemada, M.; Baranski, M.; Nobel-de Lange, M. N. J.; Vallejo, A.; Cooper, J. M. Meta-analysis of strategies to control nitrate leaching in irrigated agricultural systems and their effects on crop yield. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2013, 174: 1-10.

Raab, T. K.; Terry, N. Nitrogen source regulation of growth and photosynthesis in *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 1994, 105: 1159–1166.

Ranjan, R.; Lewak, S. Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in non-stratified apple embryos. *Physiol. Plant.* 1992, 86: 335–339.

Reeves, D. W.; Touchton, J. T. Relative phytotoxicity of dicyandiamide and availability of its nitrogen to cotton, corn, and grain sorghum. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1986, 50: 1353–1357.

Reeves, D. W.; Touchton, J. T.; Rickerl, D. H. Effect of nitrogen source and dicyandiamide on growth and water relation of cotton. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 1988, 52: 281–285.

Reinbothe, C.; Springer, A.; Samol, I.; Reinbothe, S. Plant oxylipins: role of jasmonic acid during programmed cell death, defence and leaf senescence. *FEBS J.* 2009, 276: 4666–4681.

Rhine, E. D.; Sims, G. K.; Mulvaney, R. L.; Pratt, E. J. Improving the Berthelot reaction for determining ammonium in soil extracts and water. *Soil Science Society of America Journal* 1998, 2: 473-480.

Rhodes, D.; Verslues, P. E.; Sharp, R. E. Role of amino acids in abiotic stress resistance. ed. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology* 1999: 319–356.

Rigaud, J.; Puppo, A. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 1975, 88: 223–228.

Robertson, G. P. Nitrification and denitrification in humid tropical systems: Potential controls on nitrogen retention. In “Mineral nutrients in tropical forest and savanna ecosystems”. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1989: 55–69.

Rodrigues, J. M.; Lasa, B.; Aparicio-Tejo, P. M.; Golzález-Murua, C.; Marino, D. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate and 2-(*N*-3,4-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl) succinic acid isomeric mixture nitrification inhibitors: Quantification in plant tissues and toxicity assays. *Sci. Total Environm.* 2018, 624:1180-1186.

Ruser, R; Schulz, R. The effect of nitrification inhibitors on the nitrous oxide (N₂O) release from agricultural soils - a review. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2015, 178: 171–188.

Sagi, M.; Omarov, R. T.; Lips, S. H. The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.* 1998, 135: 125–135.

Salsac, L, Chaillou, S; Morot-Gaudry, J. F.; Lesaint, C.; Jolivoie, E. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiology & Biochemistry.* 1987, 25: 805–812.

Sánchez, D. H.; Lippold, F.; Redestig, H.; Hannah, M. A.; Erban, A.; Krämer, U.; Kopka, J.; Udvardi, M. K. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. *The Plant Journal* 2008, 53: 973–987.

Sánchez, D. H.; Schwabe, F.; Erban, A.; Udvardi, M. K.; Kopka, J. Comparative metabolomics of drought acclimation in model and forage legumes. *Plant Cell and Environment* 2012, 35 (136): 149.

Sato, S.; Nakamura, Y.; Kaneko, T.; Asamizu, E.; Kato T.; Nakao, M.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Ono, A.; Kawashima, K.; Fujishiro, T.; Katoh, M.; Kohara, M.; Kishida, Y.; Minami, C.; Nakayama, S.; Nakazaki, N.; Shimizu, Y.; Shinpo, S.; Takahashi, C.; Wada, T.; Yamada, M.; Ohmido, N.; Hayashi, M.; Fukui, K.; Baba, T.; Nakamichi, T.; Moriy, H.; Tabata, S. "Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*". *DNA Res.* 2008, 15 (4): 227–239.

Sato, S.; Tabata, S. *Lotus japonicus* as a platform for legume research. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9: 128-132.

Schmidt, E. L. Nitrification in soil. *Nitrogen in agricultural soils*. Madison: American Society of Agronomy 1982: 253-288.

Schommer, C.; Palatnik, J. F.; Aggarwal, P.; Chetelat, A.; Cubas, P.; Farmer, E. E.; Nath, U.; Weigel, D. Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol.* 2008, 6:230.

Seinfeld, J. H.; Pandis, S. N. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 2006.

Seminário, A.; Song, L.; Zulet, A.; Nguyen, H. T.; González, E. M.; Larrainzar, E. Drought stress causes a reduction in the biosynthesis of ascorbic acid in soybean plants. *Front. Plant Sci.* 2017, 8: 1042.

Serna, M. D.; Borrás, R.; Legaz, F.; Primo-millo, E. The influence of nitrogen concentration and ammonium/nitrate ratio on N-uptake, mineral composition and yield of Citrus. *Plant Soil* 1992, 147: 13-23.

Shan, C.; Liang, Z. Jasmonic acid regulates ascorbate and glutathione metabolism in *Agropyron cristatum* leaves under water stress. *Plant Sci.* 2010, 178: 130:139.

Sharma, P.; Dubey, R. S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul.* 2005, 46: 209–221.

Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Bot.* 2012, 2012: 217037.

Shen, J. P.; Zhang, L. M.; Zhu, Y.G.; Zhang, J. B.; He, J. Z. Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam. *Environ Microbiol* 2008, 10:1601–1611.

Siddiki M. Y.; Malhotra, B.; Min, X.; Glass, A. D. M. Effects of ammonium and inorganic carbon enrichment on growth and yield of a hydroponic tomato crop. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2002, 165: 191-197.

Skiba, U.; Smith, K. A. The control of nitrous oxide emissions from agricultural and natural soils. *Chemosphere Global Change Sci.* 2000, 2: 379-386.

Smith I. K.; Kendall, A. C.; Keys, A. J.; Turner, J. C.; Lea P.J. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci. Lett.* 1984, 37: 29–33.

Smith, P.; Martino, D.; Cai, Z.; Gwary, D.; Janzen, H.; Kumar, P.; McCarl, B.; Ogle, S.; O'Mara, F.; Rice, C.; Scholes, B.; O., Sirotenko. Agriculture. In *Climate Change 2007: Mitigation. Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*; Core Writing Team, B. M, O. R. D., P. R. B., R. D and L. A. M., Eds.: Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 2007.

Smith, P.; Olesen, J. E. Synergies between mitigation of, and adaptation to, climate change in agriculture. *Journal of Agricultural Science* 2010, 148 (5), 543- 552.

Snyder, C. S.; Bruulsema, T. W.; Jensen, T. L.; Fixen, P. E. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 2009, 133: 247-266.

Somerville, H. J. Pesticides, microorganisms and environment. *SPAN* 1978, 21: 35–37.

Stitt, M.; Müller, C.; Matt, P.; Gibon, Y.; Carillo, P.; Morcuende, R.; Scheible, W. R.; Krapp, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 2002, 53: 959–970.

Subbarao, G. V.; Ito, O.; Sahrawat, K. L.; Berry, W. L.; Nakahara, K.; Ishikawa, T.; Watanabe, T.; Suenaga, K.; Rondon, M.; Rao, I. M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems - challenges and opportunities. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 2006, 25: 303–335.

Subbarao, G. V.; Ito, O.; Sahrawat, K. L.; Berry, W. L.; Nakahara, K.; Ishikawa, T.; Watanabe, T.; Suenaga, K.; Rondon, M.; Rao, I. M. Scope and strategies for regulation of nitrification in agricultural systems-challenges and opportunities. *Critical Reviews in Plant Science* 2006, 25: 303–335.

Subbarao, G. V.; Yoshihashi, T.; Worthington, M.; Nakahara, K.; Ando, Y.; Sahrawat, K. L.; Rao, I. M.; Lata, J. C.; Kishii, M.; Braun, H. J.; Suppression of soil nitrification by plants *Plant Sci.* 2015, 233: 155-164.

Szczerba, M. W.; Britto, D. T.; Ali, S. A.; Balkos, K. D.; Kronzucker, H. J. NH_4^{+} -stimulated and -inhibited components of K^{+} transport in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Botany* 2008, 59: 3415–3423.

Tang, W. H.; Shilov, I. V.; Seymour, S. L. Nonlinear fitting method for determining local false discovery rates from decoy database searches. *J. Proteome Res.* 2008, 7 (9): 3661–3667.

Tcherkez, G.; Hodges, M. How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interactions with (photo)respiration in C_3 leaves. *Journal of Experimental Botany* 2008, 59: 1685–1693.

Tilman, D.; Cassman, K. G.; Matson, P. A.; Naylor R.; Polasky S. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 2002, 418: 671-677.

Tindaon, F.; Benckiser, G. Evaluation of ecological doses of the nitrification inhibitors 3, 4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) and 4-chloromethylpyrazole (CIMP) in comparison to dicyandiamide (DCD) in their effects on dehydrogenase and dimethyl sulfoxide reductase activity. 2012, 48: 643–650.

Topp, E.; Knowles, R. Effects of nitrapyrin [2-chloro-6-(trichloromethyl) pyridine] on the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, 47: 258–262.

Torralbo, F.; Menéndez, S.; Barrena, I.; Estavillo, J. M.; Marino, D.; González-Murua, C. Dimethyl pyrazol-based nitrification inhibitors effect on nitrifying and denitrifying bacteria to mitigate N₂O emission. *Scientific Reports* 2017, 7: 13810.

Udvardi, M. K.; Tabata, S.; Parniske, M.; Stougaard, J. *Lotus japonicus*: Legume research in the fast lane. *Trends in Plant Sciences* 2005, 10: 222-228.

Ussiri, D.; Lal, R. The Role of Nitrous Oxide on Climate Change. *Soil Emission of Nitrous Oxide and its Mitigation*. Springer Netherlands 2013: 1-28.

van Kessel, M. A. H. J.; Speth, D. R.; Albertsen, M.; Nielsen, P. H.; Camp den, H. J. M. O.; Kartal, B.; Jetten, M. S. M.; Lucker, S. Complete nitrification by a single microorganism. *Nature* 2015, 528: 555–559.

Vilsmeier, K. Fate of ammonium-N in pot studies as affected by DCD addition. *Fertil. Res.* 1991, 29: 187–189.

Xu, Y, G.; Yu, W. T.; Ma, Q.; Zhou, H. Responses of bacterial and archaeal ammonia oxidisers of an acidic luvisols soil to different nitrogen fertilization rates after 9 years. *Biol Fertil Soils* 2012, 48: 827-837.

Wang, H.; Wang, H.; Shao, H.; Tang, X. Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Front. Plant Sci* 2016. 7:67.

Webb, J. A.; Fletcher, R. A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from injury due to waterlogging. *Plant Growth Regulation* 1996, 18: 201-206.

Webb, J.; Froment, M.; Sylvester-Bradley, R. Effects of cultivation and nitrification inhibitor on soil nitrogen availability after a grass ley and on the response of the following cereal crop to fertilizer nitrogen. *J. Agric. Sci.* 1991, 117: 9–21.

Weiner, I. D.; Verlander, J. W. Role of NH_3 and NH_4^+ transporters in renal acid–base transport. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 2011, 300: 11–23.

Weiske, A.; Benckiser, G.; Herbert, T.; Ottow, J. C. G. Influence of the nitrification inhibitor 3,4-dimethylpyrazole phosphate (DMPP) in comparison to dicyandiamide (DCD) on nitrous oxide emissions, carbon dioxide fluxes and methane oxidation during 3 years of repeated application in field experiments. *Biol. Fertil. Soils* 2001, 34: 109–117.

Whitman, W. B.; Bowen, T. L.; Boone, D. R. The methanogenic bacteria. In *The prokaryotes*. Springer New York. 2006: 165-207.

Wissemeier, A. H.; Linzmeier, W.; Gutser, R.; Weigelt, W.; Schmidhalter, U. The new nitrification inhibitor DMPP (ENTE[®]) - Comparisons with DCD in model studies and field applications. *Plant Nutr. Dev. Plant Soil Sci.* 2001, 92: 741–742.

Woodall, J.; Forde, B. G. Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ.* 1996, 19: 848–858.

World Meteorological Organization. Greenhouse Gas Bulletin; The State of Greenhouse Gases in the Atmosphere Using Global Observations through 2008. World Meteorological Organization, Atmospheric Environment Research Division, Research Department, Geneva, 2009.

Yang, J. B.; Li, X. C.; Xu, L.; Hu, F.; Li, H. X.; Liu, M. Q. Influence of the nitrification inhibitor DMPP on the community composition of ammonia-oxidizing bacteria at microsites with increasing distance from the fertilizer zone. *Biol. Fertil. Soils* 2013, 49: 23-30.

Yang, M.; Fang, Y.; Sun, D.; Shi, Y. Efficiency of two nitrification inhibitors (dicyandiamide and 3, 4-dimethylpyrazole phosphate) on soil nitrogen transformations and plant productivity: a meta-analysis. *Sci. Rep.* 2016, 6: 22075.

Yoneyama, T.; Matsumaru, T.; Usui, K.; Engelaar, W. M. H. G. Discrimination of nitrogen isotopes, during absorption of ammonium and nitrate at different nitrogen concentrations by rice (*Oryza sativa* L.) plants. *Plant Cell. Environ.* 2001, 24:133-139.

Zabalza, A.; Gaston, S.; Sandalio, L. M.; del Río, L. A.; Royuela, M. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase, *Environ. Exp. Bot.* 2007, 59: 150–159.

Zabalza, A.; van Dongen, J. T.; Froehlich, A.; Oliver, S. N.; Faix, B.; Gupta, K. J.; Schmalzlin, E.; Igal, M.; Orcaray, L.; Royuela, M.; Geigenberger, P Regulation of respiration and fermentation to control the plant internal oxygen concentration. *Plant Physiology* 2009, 149: 1087–1098.

Zeng, N.; Zhao, F.; Collatz, G. J.; Kalnay, E.; Salawitch, R. J.; West, T. O.; Guanter, L. Agricultural Green Revolution as a driver of increasing atmospheric CO₂ seasonal amplitude. *Nature* 2014, 515: 394-397.

Zerulla, W.; Barth, T.; Dressel, J.; Erhardt, K.; Horschler von Locquenghien, K.; Pasda, G.; Rädle, M.; Wissemeyer, A. 3,4-Dimethylpyrazole phosphate (DMPP) - A new nitrification inhibitor for agriculture and horticulture. An introduction. *Biol. Fertil. Soils* 2001, 34: 79–84.

Zhang, H. J.; Wu, Z. J.; Zhou, Q. X. Dicyandiamide sorption–desorption behaviour on soils and peat humus. *Pedosphere* 2004, 14: 395-399.

Zheng, Z. Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 2009, 4: 584–591.

Zhou, M.; Butterbach-Bahl, K.; Vereecken, H.; Brüggemann, N. A meta-analysis of soil salinization effects on nitrogen pools, cycles and fluxes in coastal ecosystems. *Global Change Biology* 2016, 23: 1338–1352.

Zucconi, F.; Pera, A.; Forte, M.; De Bertoldi, M. Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 1981, 22: 54–57.

Zulet, A.; Gil-Monreal, M.; Villamor, J.G.; Zabalza, A.; van der Hoorn, R. A. L.; Royuela, M. Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *PLoS One* 2013, 8: e73847.

DATOS SUPLEMENTARIOS

Figure S1. Chromatogram of organics acid in a standard solution (black line), and different concentrations of DMPA: 1 ppm (yellow line), 10 ppm (blue line) and 100 ppm (purple line) (A). 1- Quinate; 2- Acetate; 3- Lactate; 4- Chlorure; 5- Nitrite; 6- Piruvate; 7- Nitrate; 8- Malate; 9- Succinate; 10- Oxalacetate; 11- Phosphate; 12- α -Ketoglutarate

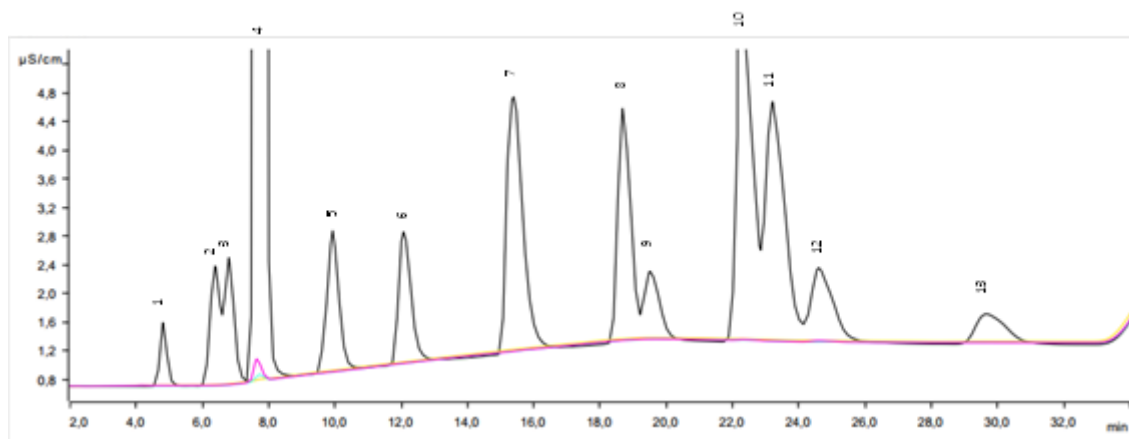


Tabla Suplementaria S1.1. Lista de todos los genes inducidos (*up-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. Fold change (FC) los valores para los genes inducidos o reprimidos por el inhibidor DMPP se dan como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Lotus 3.0	Probe Name	Probeset	Blast Description (LotusBase/NCBI)	FC (log ₂)	P-value
Lj0g3v0116489.1	CUST_42804_P426895923	TM1490.14.1	Uncharacterized protein isoform 1	2,45	2,00E-04
Lj6g3v2019770.1	CUST_22623_P426895923	chr6.TM1763.5	Uncharacterized protein TCM_029854	2,39	0
Lj3g3v0740450.1	CUST_30569_P426895923	chr3.CM0241.7	Uncharacterized protein isoform 1	2,01	0
Lj0g3v0340279.1	CUST_45250_P426895923	chr3.CM0213.28	Unknown	2,01	0
Lj1g3v3477210.1	CUST_14260_P426895923	chr1.TM0430.1	Male sterility 5 family protein	1,98	0
Lj0g3v0157999.1	CUST_31381_P426895923	chr1.CM0147.54	PREDICTED: transcription factor ORG2-like	1,96	0
Lj4g3v0586770.1	CUST_17416_P426895923	chr4.CM0227.6	transcription factor AP2-EREBP	1,91	0
Lj2g3v20088190.1	CUST_43004_P426895923	chr2.CM0060.58	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF061-like	1,85	0
Lj0g3v0038179.1	CUST_24102_P426895923	Ljwgs_012959.1.1	MTD2	1,81	0
Lj0g3v0202379.2	CUST_42970_P426895923	Ljwgs_105845.1	PREDICTED: transcription factor ORG2-like	1,77	1,00E-04
Lj0g3v0317699.1	CUST_38382_P426895923	Ljwgs_146586.1	ethylene response factor 11	1,68	0
Lj5g3v2056190.1	CUST_35346_P426895923	chr5.CM0357.10	Phosphate metabolism protein	1,67	0
Lj0g3v0245429.1	CUST_12338_P426895923	TM0448.5.1	PREDICTED: F-box protein At2g27310-like	1,67	0
Lj0g3v0346819.1	CUST_42952_P426895923	Ljwgs_036303.1	NAC domain protein NAC3	1,61	0
Lj2g3v2136010.1	CUST_46356_P426895923	chr2.CM0504.29	ascorbate oxidase	1,61	0
Lj4g3v0137750.1	CUST_33684_P426895923	chr4.CM0026.14	PREDICTED: probable F-box protein At4g22030-like	1,59	0
Lj2g3v1988920.2	CUST_4883_P426895923	gi29966744	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases isoform 1	1,55	0
Lj5g3v2056180.1	CUST_36856_P426895923	chr3.CM0711.55	Phosphate metabolism protein	1,53	0
Lj5g3v0279120.1	CUST_23821_P426895923	chr5.CM0335.17	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At2g30600-like	1,52	0
Lj2g3v1988800.1	CUST_30685_P426895923	chr2.CM0021.61	beta-amylase	1,50	0
Lj3g3v2983920.1	CUST_49458_P426895923	chr2.TM0871.6.1	nematode resistance HS1pro1 protein	1,50	0
Lj6g3v0485170.1	CUST_24269_P426895923	chr4.CM0617.21	Oxidative stress 3	1,49	0
Lj3g3v0397240.1	CUST_48173_P426895923	chr3.CM0176.34	PREDICTED: transcription factor JUNGBRUNNEN 1-like	1,49	0
Lj2g3v1391600.1	CUST_15615_P426895923	Ljwgs_049248.1	PREDICTED: U-box domain-containing protein 19-like	1,47	0
Lj0g3v0194509.1	CUST_23550_P426895923	chr2.CM0304.46.1	PREDICTED: F-box protein PP2-A12-like	1,47	0
Lj3g3v0424110.1	CUST_37648_P426895923	chr3.CM0059.33	Unknown	1,44	0
Lj1g3v1287000.1	CUST_42873_P426895923	Ljwgs_051232.1	Ring-H2 zinc finger protein	1,44	0
Lj2g3v3071890.1	CUST_30988_P426895923	chr2.TM1517.10.2	preprotein translocase	1,43	1,00E-04
Lj4g3v2456250.1	CUST_51461_P426895923	Ljwgs_008710.1	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 169	1,41	0
Lj0g3v0059519.1	CUST_51294_P426895923	chr2.TM1659.10.1	Polyadenylate binding protein	1,41	0
Lj2g3v2016240.1	CUST_37556_P426895923	chr2.CM0304.42	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF026-like	1,36	1,00E-04
Lj4g3v3002710.1	CUST_31640_P426895923	chr4.CM0025.25	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 41-like	1,30	0
Lj4g3v2023950.1	CUST_38699_P426895923	Ljwgs_046836.1	PREDICTED: probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase	1,28	0
Lj3g3v0666900.1	CUST_26923_P426895923	chr3.CM0590.29	NAC domain protein	1,27	0
Lj3g3v3348620.1	CUST_49030_P426895923	chr3.CM0091.75	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At1g63850-like	1,27	0
Lj1g3v3542680.1	CUST_36810_P426895923	chr1.TM1666.15	PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	1,26	0
Lj1g3v1788290.1	CUST_27562_P426895923	chr1.CM0133.75	MTD1	1,26	0
Lj0g3v0322429.1	CUST_40130_P426895923	Ljwgs_009295.1	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase HSL2	1,25	0
Lj0g3v0208309.1	CUST_32313_P426895923	TM0936.5	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 33	1,22	0
Lj5g3v0065670.1	CUST_4077_P426895923	gi45348922	PREDICTED: transcriptional activator Myb-like	1,21	0
Lj1g3v4202380.1	CUST_13474_P426895923	chr1.CM0398.12	PREDICTED: triacylglycerol lipase SDP1-like	1,20	0
Lj0g3v0298769.1	CUST_43222_P426895923	Ljwgs_021425.1	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 41-like	1,20	0
Lj5g3v1749310.1	CUST_25119_P426895923	chr4.CM0006.37	PREDICTED: protein TIFY 10A-like	1,20	0
Lj0g3v0108699.1	CUST_39621_P426895923	chr1.CM0496.1	OBP3-responsive gene 1 isoform 2	1,19	0
Lj3g3v1145810.1	CUST_49168_P426895923	Ljwgs_035579.1	PREDICTED: cytochrome P450 94A1-like [Cicer arietinum] gi502145722 ref XP_004506151.1	1,18	0
Lj3g3v0012350.1	CUST_46655_P426895923	TM0845.2	WRKY78	1,18	0
Lj2g3v0608550.1	CUST_11806_P426895923	Ljwgs_026439.1	Unknown	1,18	0
Lj1g3v3847460.1	CUST_40145_P426895923	chr5.CM0911.3	ACT domain repeat 6	1,18	0
Lj5g3v0691270.1	CUST_42443_P426895923	Ljwgs_132519.1	Threonine dehydratase biosynthetic	1,17	0
Lj2g3v1988790.2	CUST_47751_P426895923	chr2.CM0021.54	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: beta-amylase 3, chloroplastic-like, partial	1,17	0
Lj1g3v2141050.1	CUST_36702_P426895923	chr3.TM1587.23	Unknown	1,16	0
Lj0g3v0351549.1	CUST_18930_P426895923	Ljwgs_059874.1	PREDICTED: protein phosphatase 2C 37-like	1,16	0
Lj0g3v0344009.1	CUST_45840_P426895923	Ljwgs_015170.1	Uncharacterized protein TCM_027333	1,16	0
Lj0g3v0327019.1	CUST_41193_P426895923	Ljwgs_028172.2	PLATZ transcription factor family protein isoform 1	1,16	0
Lj3g3v3033270.1	CUST_19886_P426895923	chr3.CM0396.31.1	PREDICTED: RING finger and CHY zinc finger domain-containing protein 1-like	1,16	0
Lj5g3v1167370.1	CUST_20564_P426895923	chr5.CM0341.27	transcription factor AP2-EREBP	1,15	0
Lj1g3v4899040.1	CUST_19841_P426895923	Ljwgs_005308.2	PREDICTED: xyloglucan 6-xylosyltransferase-like	1,15	0
Lj4g3v0435290.1	CUST_24859_P426895923	Ljwgs_028964.1	PREDICTED: cell number regulator 5-like	1,14	0
Lj0g3v0243699.1	CUST_457_P426895923	TC19862	Unknown	1,12	0
Lj1g3v4979990.1	CUST_35875_P426895923	Ljwgs_069578.1	bZIP transcription factor bZIP105	1,12	0
Lj1g3v1302660.1	CUST_38059_P426895923	Ljwgs_149307.1	PREDICTED: hexokinase-1-like	1,11	0
Lj3g3v2825320.1	CUST_39988_P426895923	chr3.CM0160.40	PREDICTED: glutaredoxin-C9-like	1,10	0
Lj3g3v0548550.1	CUST_33025_P426895923	chr3.CM0080.26	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 2-like	1,10	0

Tabla Suplementaria S1.1. (Continua) Lista de todos los genes inducidos (*up-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. Fold change (FC) los valores para los genes inducidos o reprimidos por el inhibidor DMPP se dan como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Lotus 3.0	Probe Name	Probeset	Blast Description (LotusBase/NCBI)	FC (log ₂)	P-value
Lj3g3v0719960.1	CUST_18538_P426895923	chr3.CM0423.32	nuclear transport factor 2 and RNA recognition motif domain-containing protein	1,09	0
Lj5g3v1235710.1	CUST_37839_P426895923	Ljwgs_039215.1	PREDICTED: alpha-galactosidase-like	1,09	1,00E-04
Lj2g3v0894410.1	CUST_39828_P426895923	Ljwgs_073249.1	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: inositol oxygenase 2-like	1,08	0
Lj6g3v0714560.1	CUST_39932_P426895923	Ljwgs_062702.1	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase At4g11680-like	1,08	0
Lj3g3v2746090.1	CUST_51330_P426895923	chr3.CM0711.9	Unknown	1,07	0
Lj0g3v0330909.1	CUST_36757_P426895923	Ljwgs_120786.1	transcription factor [Glycine max] gi 351725863 ref NP_001237619.1	1,07	0
Lj6g3v0291930.1	CUST_51697_P426895923	gi15485717	selenium binding protein	1,06	0
Lj3g3v2662050.1	CUST_29505_P426895923	Ljwgs_091781.1	PREDICTED: linoleate 9S-lipoxygenase-like	1,06	0
Lj0g3v0136069.1	CUST_31736_P426895923	Ljwgs_033155.1	PREDICTED: transcription factor MYC2-like	1,06	0
Lj5g3v2058570.1	CUST_27692_P426895923	chr5.CM0956.10	PREDICTED: protein FANTASTIC FOUR 3-like [Cicer arietinum] gi 502119881 ref XP_004496767.1	1,06	0
Lj0g3v0322949.1	CUST_36998_P426895923	Ljwgs_024614.1	F-box protein PP2-B3	1,05	0
Lj3g3v2744030.1	CUST_39400_P426895923	chr3.CM0711.3.1	2-nonaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	1,04	0
Lj4g3v0975500.1	CUST_35324_P426895923	chr4.CM0131.11	Uncharacterized protein TCM_000343	1,04	0
Lj5g3v0310140.1	CUST_10605_P426895923	chr5.CM0096.42.2	PREDICTED: centromere-associated protein E-like	1,04	0
Lj3g3v2987100.2	CUST_14779_P426895923	chr3.CM0164.18	PREDICTED: F-box protein At2g27310-like	1,04	0
Lj5g3v2013730.1	CUST_41013_P426895923	chr5.CM0148.34	PREDICTED: CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 25-like	1,03	0
Lj0g3v0312569.1	CUST_36506_P426895923	Ljwgs_023649.1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2-like	1,03	0
Lj3g3v2887190.1	CUST_45516_P426895923	Ljwgs_037732.1	PREDICTED: G-type lectin S-receptor-like serine/threonine-protein kinase At2g19130-like	1,03	0
Lj3g3v0290450.1	CUST_33150_P426895923	CM1488.57	PREDICTED: IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4-like	1,02	0
Lj1g3v03902620.1	CUST_42408_P426895923	chr1.TM0356.18.1	CONSTANS-like protein	1,01	0
Lj3g3v2466460.1	CUST_11505_P426895923	Ljwgs_123903.1	Unknown	1,00	0
Lj2g3v1510600.1	CUST_48579_P426895923	chr2.TM0230.3	PREDICTED: probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 30-like	1,00	0
Lj5g3v0629150.1	CUST_39202_P426895923	Ljwgs_041478.1	Uncharacterized protein TCM_022158	1,00	0
Lj6g3v1880270.1	CUST_46242_P426895923	chr6.CM0139.42	PREDICTED: basic 7S globulin-like	0,99	0
Lj4g3v1335210.1	CUST_9006_P426895923	Ljwgs_039914.1	PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	0,98	0
Lj0g3v0059519.2	CUST_34236_P426895923	chr3.CM0213.28.1	Polyadenylate binding protein	0,98	0
Lj0g3v0363279.1	CUST_39249_P426895923	Ljwgs_063776.1	PREDICTED: miraculin-like	0,97	0
Lj6g3v1078040.3	CUST_41088_P426895923	chr6.CM0037.45	Serine decarboxylase	0,97	0
Lj5g3v1355050.1	CUST_24251_P426895923	Ljwgs_013506.2	PREDICTED: basic 7S globulin-like	0,96	0
Lj0g3v0264429.1	CUST_2919_P426895923	gi45348156	Uncharacterized protein isoform 1	0,96	1,00E-04
Lj5g3v0510930.1	CUST_13178_P426895923	Ljwgs_116566.2	PREDICTED: L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.1-like	0,96	0
Lj6g3v1901410.1	CUST_44713_P426895923	chr6.CM0539.23	PREDICTED: peptide methionine sulfoxide reductase B3, chloroplast-like	0,95	0
Lj0g3v0196109.1	CUST_27558_P426895923	Ljwgs_052423.1	2-nonaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	0,94	1,00E-04
Lj0g3v0167289.1	CUST_239_P426895923	TC18644	Unknown	0,94	0
Lj1g3v3380980.1	CUST_1036_P426895923	TC17902	Unknown	0,94	0
Lj2g3v2573410.1	CUST_37479_P426895923	chr2.CM0405.32.2	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: transcription repressor MYB4-like	0,93	0
Lj3g3v2658850.1	CUST_5935_P426895923	Ljwgs_025393.2	PREDICTED: solute carrier family 25 member 44-like	0,93	0
Lj3g3v3487870.1	CUST_10282_P426895923	chr3.CM0112.41	heat shock protein, partial	0,92	0
Lj2g3v1058070.1	CUST_33925_P426895923	Ljwgs_043278.1	MYB transcription factor MYB60	0,92	0
Lj6g3v0523980.1	CUST_1696_P426895923	gi45414590	Alpha/beta hydrolase related protein	0,91	0
Lj4g3v0338230.1	CUST_6223_P426895923	chr6.CM0314.34	sulphate transporter	0,91	0
Lj5g3v2099470.1	CUST_46338_P426895923	chr5.CM0200.125	PREDICTED: octanoyltransferase-like	0,91	0
Lj2g3v2843490.1	CUST_11741_P426895923	chr2.CM1032.30	Sodium-coupled neutral amino acid transporter	0,91	0
Lj4g3v2951040.1	CUST_13527_P426895923	chr4.CM0558.41	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: protein LURP-one-related 4-like	0,91	0
Lj3g3v0139510.1	CUST_18700_P426895923	chr3.CM0253.22	PREDICTED: F-box/kelch-repeat protein At1g80440-like	0,91	1,00E-04
Lj3g3v3752270.1	CUST_27797_P426895923	Ljwgs_025113.1	PREDICTED: serine/threonine-protein kinase-like protein CCR4-like	0,90	0
Lj5g3v0433520.1	CUST_8618_P426895923	chr5.CM0034.38	MTD1	0,90	1,00E-04
Lj1g3v0738020.1	CUST_48878_P426895923	Ljwgs_119619.1	Serine hydroxymethyltransferase	0,89	0
Lj6g3v0030140.1	CUST_2393_P426895923	gi11065466	hypothetical protein Ost_23293	0,89	1,00E-04
Lj1g3v4979980.1	CUST_17923_P426895923	Ljwgs_032996.1	Opaque	0,88	1,00E-04
Lj1g3v062680.1	CUST_32201_P426895923	chr1.CM0105.129	PREDICTED: RING-H2 finger protein ATL3-like [Glycine max] gi 356506122 ref XP_003521836.1	0,88	0
Lj5g3v1914110.1	CUST_17880_P426895923	Ljwgs_048054.1	GIGANTEA	0,87	0
Lj0g3v0286389.1	CUST_45173_P426895923	Ljwgs_062696.0.1	Unknown	0,87	0
Lj3g3v2987120.1	CUST_31832_P426895923	chr3.CM0164.21	PREDICTED: F-box protein At2g27310-like	0,87	1,00E-04
Lj0g3v0023269.1	CUST_44013_P426895923	TM0810.10.1	Unknown	0,86	1,00E-04
Lj2g3v0508600.1	CUST_32564_P426895923	Ljwgs_053927.1	Receptor-like protein kinase	0,86	0
Lj1g3v2953540.1	CUST_6768_P426895923	chr1.CM0315.50	Unknown	0,86	0
Lj1g3v0569370.2	CUST_14766_P426895923	chr1.TM0092.26	PREDICTED: protein COBRA-like	0,86	0
Lj3g3v2769320.1	CUST_35573_P426895923	chr3.CM0711.26.1	Wound-responsive family protein	0,86	0
Lj5g3v1015320.1	CUST_45440_P426895923	Ljwgs_067606.1	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor 5-like	0,86	1,00E-04
Lj3g3v0821160.1	CUST_42054_P426895923	Ljwgs_118781.1	PREDICTED: protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like isoform X3	0,86	1,00E-04
Lj1g3v0605120.1	CUST_34783_P426895923	Ljwgs_010595.2	PREDICTED: sugar transport protein 5-like	0,85	1,00E-04
Lj2g3v0648070.1	CUST_16747_P426895923	Ljwgs_014749.1.1	PREDICTED: mitogen-activated protein kinase kinase 4-like	0,85	1,00E-04
Lj0g3v0242739.1	CUST_1355_P426895923	gi45640312	PREDICTED: zinc finger CCH domain-containing protein 20-like	0,85	1,00E-04
Lj2g3v1168830.1	CUST_11369_P426895923	chr2.TM1731.12	MYB-type transcription factor	0,84	0
Lj0g3v0272279.1	CUST_35892_P426895923	Ljwgs_033475.1	PREDICTED: F-box protein PP2-A13-like	0,84	1,00E-04
Lj0g3v0288109.1	CUST_17799_P426895923	Ljwgs_015587.1	PREDICTED: vacuolar amino acid transporter 1-like isoform 2	0,84	1,00E-04
Lj4g3v03030590.1	CUST_11543_P426895923	Ljwgs_078086.1	PREDICTED: zinc finger CCH domain-containing protein 20-like	0,83	1,00E-04
Lj1g3v2065420.1	CUST_1126_P426895923	TC13672	PREDICTED: casein kinase I isoform delta-like	0,83	1,00E-04
Lj4g3v2618430.1	CUST_13218_P426895923	chr4.CM0046.46	Fasciclin-like arabinogalactan protein	0,83	1,00E-04

Tabla Suplementaria S1.1. (Continua) Lista de todos los genes inducidos (*up-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. Fold change (FC) los valores para los genes inducidos o reprimidos por el inhibidor DMPP se dan como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Lotus 3.0	Probe Name	Probeset	Blast Description (LotusBase/NCBI)	FC (log ₂)	P-value
Lj6g3v0551670.1	CUST_50358_P426895923	Ljwgs_030255.1	PREDICTED: lanC-like protein 2-like	0,82	1,00E-04
Lj1g3v0318150.1	CUST_25911_P426895923	Ljwgs_014066.1	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	0,82	1,00E-04
Lj1g3v1134110.1	CUST_18226_P426895923	chr1.CM0320.45	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 70-like	0,82	1,00E-04
Lj2g3v1415330.1	CUST_42473_P426895923	chr2.CM0008.56	Lipase	0,81	1,00E-04
Lj0g3v0208499.1	CUST_8510_P426895923	Ljwgs_075850.1	PREDICTED: cytochrome P450 76C1-like	0,81	1,00E-04
Lj2g3v1194190.1	CUST_36907_P426895923	chr2.TM0655.2.1	Uncharacterized protein TCM_011355	0,81	1,00E-04
Lj0g3v0343449.1	CUST_6334_P426895923	Ljwgs_047295.1	PREDICTED: transcription factor MYC2-like	0,80	1,00E-04
Lj0g3v0009669.1	CUST_19947_P426895923	Ljwgs_020057.1	Auvin-induced protein 5NG4	0,80	1,00E-04
Lj3g3v3556020.1	CUST_10587_P426895923	chr3.CM0460.28	NAC domain protein NAC6	0,79	1,00E-04
Lj3g3v2921090.1	CUST_39883_P426895923	chr3.CM0243.4	galactose oxidase	0,79	1,00E-04
Lj4g3v1983390.1	CUST_15000_P426895923	chr4.CM0179.8	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein At2g24240-like	0,79	2,00E-04
Lj1g3v1136230.1	CUST_11399_P426895923	chr1.CM0320.15	Unknown	0,79	2,00E-04
Lj2g3v1415080.1	CUST_6728_P426895923	chr2.CM0008.36	PREDICTED: F-box/kelch-repeat protein At1g23390-like	0,78	1,00E-04
Lj0g3v0076039.1	CUST_7946_P426895923	chr2.CM0056.12	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase At4g11680-like	0,78	1,00E-04
Lj1g3v3580300.1	CUST_46609_P426895923	chr1.TM1516.19.3	legume-specific protein	0,78	1,00E-04
Lj0g3v0123979.1	CUST_38933_P426895923	Ljwgs_010368.1	PREDICTED: thioredoxin-like 1-1, chloroplastic-like	0,77	2,00E-04
Lj4g3v2827860.1	CUST_51276_P426895923	chr4.TM0844.22	PREDICTED: NAC domain-containing protein 2-like	0,77	2,00E-04
Lj0g3v0066279.1	CUST_34222_P426895923	Ljwgs_030276.1	PREDICTED: guanine deaminase-like isoform X1	0,77	2,00E-04
Lj6g3v2019730.1	CUST_22621_P426895923	chr6.TM1763.7	Transcription factor bHLH36	0,77	1,00E-04
Lj3g3v2809120.1	CUST_47605_P426895923	Ljwgs_035843.1	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase RMA1H1-like	0,76	2,00E-04
Lj3g3v2693100.2	CUST_47078_P426895923	Ljwgs_030376.1	PREDICTED: beta-galactosidase 1-like	0,76	1,00E-04
Lj1g3v4921040.1	CUST_20831_P426895923	Ljwgs_077870.1	Heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein	0,76	0
Lj3g3v0509780.1	CUST_39847_P426895923	chr3.TM0984.3	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF034-like	0,75	2,00E-04
Lj1g3v4790920.1	CUST_26776_P426895923	chr1.CM0206.61	GDSL esterase/lipase	0,74	1,00E-04
Lj3g3v2315510.1	CUST_6757_P426895923	Ljwgs_042433.1.1	Unknown	0,74	2,00E-04
Lj0g3v0362609.1	CUST_11817_P426895923	Ljwgs_064487.1	PREDICTED: ankyrin repeat-containing protein At3g12360-like	0,74	1,00E-04
Lj2g3v0039350.1	CUST_8537_P426895923	Ljwgs_120504.2	Uncharacterized protein TCM_037289	0,74	1,00E-04
Lj1g3v3597180.1	CUST_39166_P426895923	chr1.CM0800.61	Unknown	0,74	2,00E-04
Lj1g3v2065490.1	CUST_29321_P426895923	Ljwgs_010369.1	PREDICTED: E3 ubiquitin-protein ligase ATL42-like	0,73	2,00E-04
Lj6g3v2079260.1	CUST_20386_P426895923	Ljwgs_067626.1	Cotton fiber expressed protein [Medicago truncatula] gi357446343 ref XP_003593449.1	0,72	2,00E-04

Tabla Suplementaria S1.2. Lista de todos los genes reprimidos (*down-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. Fold change (FC) los valores para los genes inducidos o reprimidos por el inhibidor DMPP se dan como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Lotus 3.0	Probe Name	Probeset	Blast Description (LotusBaseNCBI)	FC (log ₂)	P-value
L3q3v2904060.1	CUST_13096_P1426895923	TM0780.8	Unknown	-0.82	1,00E-04
L1q3v2752310.1	CUST_2849_P1426895923	qi45637978	Unknown	-0.85	1,00E-04
L6q3v1875700.1	CUST_8693_P1426895923	chr6.CM0139.92	Uncharacterized protein TCM_030219	-0.86	1,00E-04
L1q3v2326740.1	CUST_35558_P1426895923	chr1.BM1732.2	PREDICTED: leucoanthocyanidin dioxygenase-like	-0.87	1,00E-04
L4q3v3055130.1	CUST_14061_P1426895923	chr4.CM0617.41	PREDICTED: dehydration-responsive element-binding protein 3-like	-0.87	0
L5q3v0240220.1	CUST_28148_P1426895923	CM1324.23	PREDICTED: vacuolar protein sorting-associated protein 35-like	-0.87	1,00E-04
L0q3v0128619.1	CUST_11018_P1426895923	Ljwgs_043185.1	Sieve element-occluding protein	-0.87	1,00E-04
L1q3v4669300.1	CUST_31924_P1426895923	chr1.CM0012.67	Thaumatococcus-like protein	-0.87	1,00E-04
L0q3v0047999.1	CUST_44261_P1426895923	Ljwgs_023316.2	Uncharacterized protein TCM_030219	-0.89	1,00E-04
L5q3v1697000.1	CUST_14072_P1426895923	chr5.CM0909.45	PREDICTED: probable glutathione S-transferase-like	-0.89	1,00E-04
L6q3v1358590.1	CUST_50804_P1426895923	chr6.TM0830.13	transcription factor/transcription regulator	-0.89	0
L0q3v0075119.1	CUST_15245_P1426895923	TM0763.11	PREDICTED: 12-oxophytodienoate reductase 3-like	-0.90	1,00E-04
L1q3v3975480.1	CUST_45531_P1426895923	chr1.TM0371.8	PREDICTED: hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase-like	-0.90	1,00E-04
L4q3v2172720.1	CUST_25816_P1426895923	chr4.CM0297.14	Calmodulin-binding protein	-0.91	1,00E-04
L0q3v0265259.1	CUST_31923_P1426895923	chr1.CM0012.64	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101512289	-0.91	1,00E-04
L1q3v4139610.2	CUST_99_P1426895923	TC19797	Peroxisomal membrane protein	-0.92	0
L1q3v0095200.1	CUST_30864_P1426895923	chr5.CM0357.22.2	seed maturation protein	-0.93	1,00E-04
L0q3v0158139.1	CUST_18884_P1426895923	chr4.CM0165.11	PREDICTED: UDP-glycosyltransferase 74E 2-like	-0.93	1,00E-04
L0q3v0144949.1	CUST_23337_P1426895923	Ljwgs_087494.1	PREDICTED: F-box protein At1g67340-like	-0.94	0
L4q3v1450980.1	CUST_47857_P1426895923	Ljwgs_017893.1	PREDICTED: protein LATERAL ORGAN BOUNDARIES-like	-0.95	1,00E-04
L5q3v1961260.1	CUST_41644_P1426895923	chr5.CM0456.22	Chitinase	-0.95	0
L0q3v0258299.1	CUST_14028_P1426895923	Ljwgs_012880.1	PREDICTED: beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I-like	-0.95	0
L5q3v1711170.1	CUST_33542_P1426895923	Ljwgs_014826.1	Sieve element-occluding protein	-0.95	1,00E-04
L0q3v0205019.1	CUST_31547_P1426895923	Ljwgs_025887.1	Homeodomain-like superfamily protein isoform 2, partial	-0.95	0
L4q3v0588830.1	CUST_51851_P1426895923	qi9968472	ferredoxin-nitrite reductase	-0.99	0
L6q3v1549210.1	CUST_8566_P1426895923	CM0385.21.1	2-succinylbenzoate-CoA lyase	-1.00	0
L0q3v0143769.1	CUST_11880_P1426895923	Ljwgs_047986.1	PREDICTED: dehydration-responsive element-binding protein 3-like	-1.00	0
L0q3v0174169.1	CUST_17632_P1426895923	Ljwgs_011747.2	Pathogen-inducible trypsin-inhibitor-like protein	-1.00	1,00E-04
L4q3v2227820.1	CUST_44048_P1426895923	Ljwgs_125461.1	ABC transporter B family member	-1.01	0
L4q3v2021680.1	CUST_20064_P1426895923	Ljwgs_065179.1	PREDICTED: tetraspanin-8-like	-1.02	0
L1q3v2068760.1	CUST_16948_P1426895923	Ljwgs_007448.1	Dioxygenase RAMOSUS1	-1.03	0
L0q3v0215769.1	CUST_14277_P1426895923	Ljwgs_020594.1	Unknown	-1.05	0
L0q3v0094119.1	CUST_23237_P1426895923	Ljwgs_020298.1	PREDICTED: probable carboxylesterase 1-like	-1.06	0
L5q3v1203340.1	CUST_8948_P1426895923	chr5.CM0071.29	PREDICTED: basic 7S globulin-like	-1.07	0
L2q3v2448200.1	CUST_6060_P1426895923	Ljwgs_044797.1	PREDICTED: 60S ribosomal protein L10-like	-1.09	0
L2q3v2855860.1	CUST_26069_P1426895923	chr1.TM1168.19	Lotus japonicus genomic DNA, chromosome 4, clone: LJT15N19, TM0097b, complete sequence.	-1.10	0
L2q3v1549830.1	CUST_34140_P1426895923	chr2.CM0803.34	PREDICTED: ubiquinol oxidase 1, mitochondrial-like	-1.12	0
L0q3v0121549.1	CUST_17824_P1426895923	Ljwgs_078032.1	phenylalanine ammonia-lyase	-1.12	0
L3q3v0323220.1	CUST_17741_P1426895923	Ljwgs_026045.1	PREDICTED: beta-fructofuranosidase, cell wall isozyme-like isoform 2	-1.12	0
L0q3v0362579.1	CUST_8173_P1426895923	Ljwgs_115910.1	PREDICTED: chitinase-like	-1.14	0
L4q3v2226800.1	CUST_46124_P1426895923	Ljwgs_001709.2	Unknown	-1.19	0
L0q3v0214389.1	CUST_47370_P1426895923	Ljwgs_053314.2	PREDICTED: hydroquinone glucosyltransferase-like	-1.20	0
L4q3v1452000.1	CUST_50844_P1426895923	Ljwgs_138785.1	PREDICTED: galactinol-sucrose galactosyltransferase-like	-1.20	0
L0q3v0161479.1	CUST_40348_P1426895923	TM0864.36	Phosphate-responsive 1 family protein	-1.22	0
L6q3v1007880.2	CUST_15414_P1426895923	Ljwgs_078569.1	NBS-LRR resistance-like protein 1N	-1.23	0
L1q3v2964770.1	CUST_27701_P1426895923	Ljwgs_102841.1	PREDICTED: Glycine max protein EXORDIUM-like	-1.25	0
L1q3v0786360.1	CUST_43590_P1426895923	TM0715.25	PREDICTED: ethylene-responsive transcription factor ERF014-like	-1.26	0
L0q3v0290579.2	CUST_28515_P1426895923	TM0864.12	Phosphate-responsive 1 family protein	-1.27	0
L2q3v1589590.1	CUST_24830_P1426895923	Ljwgs_144463.1	Auxin efflux carrier family protein isoform 1	-1.29	0
L4q3v0341230.1	CUST_45486_P1426895923	chr4.CM0182.43	2-nitropropane dioxygenase-like protein	-1.29	0
L3q3v0423740.1	CUST_21933_P1426895923	chr4.CM0073.86	Myb transcription factor	-1.30	0
L1q3v0248930.1	CUST_23287_P1426895923	TM0864.27	Phosphate-responsive 1 family protein	-1.33	0
L0q3v0199109.1	CUST_46407_P1426895923	Ljwgs_036708.1	PREDICTED: pectinesterase 2-like	-1.35	0
L0q3v0265049.1	CUST_42131_P1426895923	TM0461.28	RedName: Full=Kunitz-type trypsin inhibitor-like 2 protein; AltName: Full=Protease inhibitor from pea 2	-1.36	0
L6q3v1211840.1	CUST_9609_P1426895923	CM0601.26	Uncharacterized protein TCM_042422	-1.36	0
L1q3v2766570.1	CUST_38237_P1426895923	chr1.TM1635.18	PREDICTED: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1-like	-1.39	0
L5q3v1601810.1	CUST_8006_P1426895923	chr5.CM0239.8	PREDICTED: transcription factor MYB12-like	-1.45	0
L1q3v3023870.1	CUST_33902_P1426895923	chr1.CM0410.16	PREDICTED: agmatine coumaroyltransferase-like	-1.54	0
L5q3v0082990.1	CUST_47940_P1426895923	chr5.CM0089.120	PREDICTED: type I inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 11-like	-1.61	0
L0q3v0102419.1	CUST_30149_P1426895923	Ljwgs_053770.1	Uncharacterized protein TCM_000398	-1.64	0
L6q3v1822190.1	CUST_43526_P1426895923	Ljwgs_047159.1	PREDICTED: keratin-associated protein 5-1-like	-1.72	0
L2q3v1277810.1	CUST_20284_P1426895923	Ljwgs_097647.1	PREDICTED: extracellular ribonuclease LE-like	-1.74	0
L6q3v0339500.1	CUST_37230_P1426895923	Ljwgs_061228.1	PREDICTED: probable glutathione S-transferase parA-like	-2.01	0
L1q3v2975920.1	CUST_44618_P1426895923	chr1.CM0141.2	PREDICTED: nitrate transporter 1.5-like	-2.14	0

Tabla Suplementaria S2.1. Lista de todas las proteínas cuyo contenido aumentó (*up-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en hojas de plantas de *Lotus japonicus*. El fold change (FC) del cambio en el contenido de proteína en presencia de DMPP se indica como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Uniprot	Genebank Accesion	Lotus 3.0 best Match	Probeset	Best protein Match (Uniprot/NCBI)	FC (log ₂)	P-value
W8E7A2	AHJ61542.1	Lj6g3v0497300.2	Ljwgs_099508.1	Clathrin heavy chain	1,23	0,031
Q684K0	CAG30578.1	Lj6g3v1995950.1/Lj6g3v1995960.1	TM0674.1_s_at	Pyruvate decarboxylase isozyme 1	1,07	0,034
I3SNA5	AFK41747.1	Lj4g3v0473340.1	TM1441_27	Unknown	1,06	0,023
I3S5I6	AFK35528.1	Lj0g3v0247049.1	chr2.CM0124.73_at	class I chitinase	0,92	0,043
I3SZC0	AFK45612.1	Lj0g3v0288099.1/Lj0g3v0288089.1	Ljwgs_018926.2	carboxylesterase 1-like	0,88	0,022
B6VPZ9	CAR98204.1	Lj2g3v1014180.1/Lj2g3v1014170.1	chr2.CM0201.62.1	Formate dehydrogenase, mitochondrial	0,81	0,027
Q42899	CAA63963.1	Lj6g3v1887800.1 / Lj6g3v1887790.1	TM1765.11_s_at	Glutamine synthetase cytosolic isozyme	0,81	0,049
I3SU18	AFK43760.1	Lj6g3v2218690.1/Lj4g3v0338210.1	chr6.CM0314.35	copper chaperone homolog CCH	0,79	0,000
I3T7R4	AFK48556.1	Lj1g3v4994140.1	chr5.TM0280.5	wound-induced protein precursor	0,73	0,040
I3T2N7	AFK46779.1	Lj6g3v1513670.1	Ljwgs_103120.1	class-10 pathogenesis-related protein 1	0,73	0,034
I3SEI0	AFK38672.1	Lj4g3v0341100.1	chr4.CM0182.42	Ubiquinol oxidase/Alternative oxidase	0,67	0,027
I3SGK5	AFK39397.1	Lj0g3v0259119.1	Ljwgs_037385.1	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal-like	0,64	0,045
I3T6C5	AFK48087.1	Lj3g3v2235790.1	Ljwgs_021543.2	Unknown	0,60	0,015
I3S7Z8	AFK36390.1	Lj3g3v2148260.1	Ljwgs_024849.1	PREDICTED: cinnamoyl-CoA reductase 2	0,53	0,043
B0BLI5	BAF98221.1	Lj3g3v3363560.1	chr3.CM0216.45	Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	0,52	0,050
Q43781	CAA63894.1	Lj1g3v2050900.1 / Lj0g3v0130589.1	TM1664.2	Aspartate aminotransferase	0,51	0,014
I3SYQ7	AFK45399.1	Lj4g3v1388980.1	Ljwgs_043401.1_s_at	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,48	0,007
Q56V53	AAP81673.1	Lj4g3v3113270.2	Ljwgs_038927.1_s_at	Glutathione peroxidase	0,46	0,020
I3SM39	AFK41331.1	Lj4g3v2861680.1	gi7721242_at	PREDICTED: calnexin homolog	0,39	0,004

Tabla Suplementaria S2.2. Lista de todas las proteínas cuyo contenido disminuyó (*down-regulated*) por el tratamiento del inhibidor de la nitrificación DMPP (10 mg L⁻¹) en la parte aérea de plantas de *Lotus japonicus*. El fold change (FC) del cambio en el contenido de proteína en presencia de DMPP se indica como log₂ (p ≤ 0,05).

Code Uniprot	Genebank Accesion	Lotus 3.0 best Match	Probeset	Best protein Match (Uniprot/NCBI)	FC (log ₂)	P-value
I3S552	AFK35394.1	Lj0g3v0237929.1	Ljwgs_016728.2	Unknown	-0.38	0,017
I3SR82	AFK42774.1	Lj3g3v0821380.1	Ljwgs_025651.1.1	Dirigent protein	-0.38	0,044
I3TA50	AFK49612.1	Lj3g3v1603340.1	chr3.CM1220.38	PREDICTED: OTU domain-containing protein A3g57810	-0.40	0,038
I3S759	AFK36101.1	Lj3g3v2874710.1	chr3.CM0468.49	photosystem II biogenesis protein	-0.40	0,044
I3S3H0	AFK34812.1	Lj5g3v2242500.1	Ljwgs_011418.2	PREDICTED: glycerate dehydrogenase-like	-0.41	0,008
I3T9K2	AFK49194.1	Lj1g3v2671470.1	Ljwgs_026968.1	Unknown	-0.41	0,001
I3S696	AFK35788.1	Lj0g3v0341589.1	Ljwgs_037433.1	50S ribosomal protein L13	-0.43	0,036
I3SDD7	AFK38279.1	Lj3g3v0950140.2	Ljwgs_014507.1	Defective in cullin neddylation protein	-0.43	0,002
I3TDN4	AFK46776.1	Lj3g3v0614760.1/Lj1g3v1930190.1	chr3.CM0574.20	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-like protein	-0.43	0,029
I3SF11	AFK38853.1	Lj6g3v0609710.1	Ljwgs_013085.2	phosphomethylpyrimidine synthase, chloroplastic isoform X1	-0.44	0,011
I3SMI0	AFK41472.1	Lj0g3v0310959.1	NA	haloacid dehalogenase-like hydrolase	-0.44	0,019
I3ST49	AFK43441.1	Lj1g3v2898480.2	Ljwgs_012020.3	2-dehydro-3-deoxyphosphocetate aldolase	-0.44	0,015
I3S916	AFK36758.1	Lj5g3v0254500.1	NA	PREDICTED: thiredoxin-like protein CDS32, chloroplastic	-0.44	0,009
I3RZV6	AFK33568.1	Lj2g3v1549620.1	chr2.CM0803.16	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-0.44	0,043
I3T3C1	AFK47013.1	Lj2g3v1225640.2	Ljwgs_012487.2_at	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic isoform X1	-0.45	0,029
I3SJA2	AFK34041.1	Lj2g3v1019910.1	chr2.TM1766.18.1	Unknown	-0.46	0,014
I3SN35	AFK41677.1	Lj4g3v0972360.3	Ljwgs_009678.1	pheophytinase, chloroplastic isoform X1	-0.47	0,033
I3T342	AFK46934.1	Lj1g3v3328730.1	Ljwgs_136719.1	30S ribosomal protein 3, chloroplastic-like	-0.47	0,041
I3TAM1	AFK49563.1	Lj1g3v4875770.1/Lj0g3v0312309.1	chr1.TM1573.18	60S ribosomal protein L18-2	-0.47	0,033
I3SQB7	AFK42459.1	Lj0g3v0154099.1 / Lj0g3v0015659.1	TM0572.23	PREDICTED: photosynthetic NDH subunit of subcomplex B 5, chloroplastic [Cicer arifetium]	-0.48	0,017
I3TAK7	AFK49549.1	Lj0g3v0100069.1 / Lj0g3v0065159.1/	Ljwgs_050358.1	sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic	-0.50	0,010
I3T6D6	AFK48078.1	Lj0a3v0011899.1	chr5.CM0357.23.6	Putative GPI-anchored protein	-0.50	0,032
I3S8E7	AFK36539.1	Lj0g3v0270959.1	Ljwgs_071227.1	Ribosomal protein	-0.50	0,018
I3TOH5	AFK46017.1	Lj3g3v3678780.1	TM0845.5	ACT domain-containing protein ACR11	-0.50	0,046
I3SE24	AFK38516.1	Lj3g3v0012330.1	Ljwgs_075222.1	PREDICTED: basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 2	-0.51	0,034
I3SH82	AFK39624.1	Lj1g3v2824910.1	Ljwgs_143630.1_s_a	peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase GLO1 isoform X1	-0.52	0,016
I3T3A0	AFK46992.1	Lj4g3v3002500.1	Ljwgs_049191.1	PREDICTED: V-type proton ATPase subunit E-like	-0.53	0,013
I3SBL1	AFK37653.1	Lj5g3v0659910.2	Ljwgs_128577.2	PREDICTED: 29 kDa ribonucleoprotein A, chloroplastic	-0.56	0,002
I3TAG7	AFK49509.1	Lj0g3v0271849.3	chr5.CM0089.62	Uroporphyrinogen decarboxylase	-0.57	0,013
I3T4I5	AFK47427.1	Lj0g3v0059669.3	chr4.CM0244.39	PREDICTED: plasma membrane-associated cation-binding protein 1-like	-0.58	0,008
Q9BBS6	BAB33197.1	Lichlorog3v0000410.1	Lj_rps2	30S ribosomal protein S2, chloroplastic	-0.60	0,034
O24035	CAA71302.1	Lj1g3v4693050.1 / Lj1g3v4693060.1	gi2292920_at	Pantoate-β-alanine ligase	-0.62	0,039
I3T778	NP_084833.1	Lj0g3v0305609.2	chr6.TM0336.4	ribosomal protein L14	-0.72	0,006
I3T535	AFK47627.1	Lj1g3v0098410.1	Ljwgs_006971.1	acetyltransferase (GNAT) domain protein	-0.73	0,018
I3S284	AFK34376.1	Lj0g3v0292959.1	TM1571.10.1	Malate dehydrogenase	-0.75	0,001
I3T372	AFK46964.1	Lj6g3v0898680.1	chr6.TM1091.16	PREDICTED: protein LHCP TRANSLOCATION DEFECT	-0.85	0,010
I3SJH8	AFK40420.1	Lj0g3v0116409.1/Lj2g3v1758500.1	Ljwgs_027932.1	plant/T3A5-60 protein	-0.87	0,031
I3SUL3	AFK43955.1	Lj5g3v0529330.1	Ljwgs_038585.1.1	14 kDa proline-rich protein DC2.15-like	-0.94	0,010
I3SI27	AFK39919.1	Lj4g3v1881900.1	chr4.CM0003.22	36.4 kDa proline-rich protein	-1.00	0,001
I3SIQ0	NP_084800.1	Ljchlorog3v0000420.1	Lj_atpl	ATP synthase CF0 A subunit	-1.64	0,043

